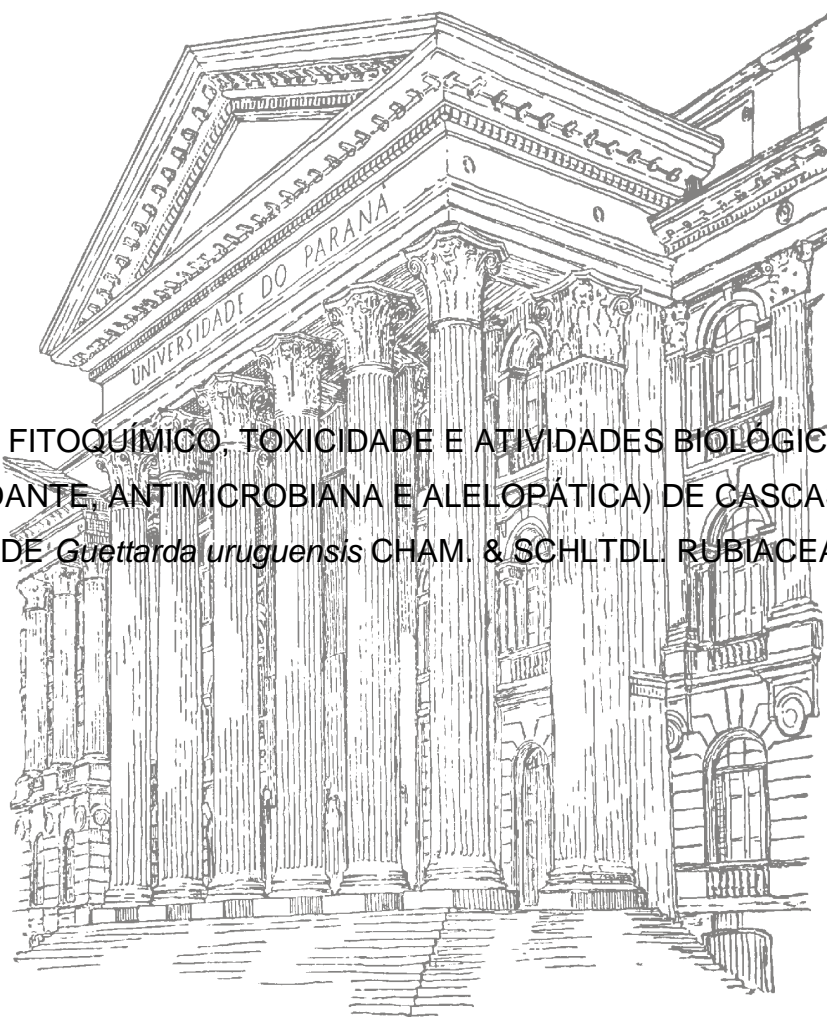


ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE

ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS:
(ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ALELOPÁTICA) DE CASCAS DO
CAULE DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL. RUBIACEAE



CURITIBA

2012

ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE

ESTUDO FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS:
(ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ALELOPÁTICA) DE CASCAS DO
CAULE DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL. RUBIACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2012

Duarte, Ana Flávia Schvabe

Estudo fitoquímico, toxicidade e atividades biológicas: (antioxidante, antimicrobiana e alelopática) de cascas do caule de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl. Rubiaceae / Ana Flávia Schvabe Duarte – Curitiba, 2012.

117 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Guettarda uruguensis*. 2. Fitoquímica. 3. Atividades biológicas. 4. Plantas medicinais. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 615.321


TERMO DE APROVAÇÃO


ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE

**Título: ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE CASCAS DO CAULE DE *Guettarda uruguensis* CHAM. &
SCHLTDL. RUBIACEAE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador


Prof.ª Dr.ª Silvana Krychak Furtado
Universidade Tuiuti do Paraná


Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de novembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À o meu orientador Prof. Obdúlio Gomes Miguel pela orientação, paciência, confiança e amizade que contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por ter compartilhado seus conhecimentos comigo.

À Prof^a Marilis Dallarmi Miguel por ter me aceitado como orientanda e ter me recebido no laboratório de Farmacotécnica

Ao Prof. Vitor Alberto Kerber por sempre ser tão acessível e solícito, por todas as conversas científicas e palavras de ânimo nos momentos mais difíceis.

À Prof^a Tomoe Nakashima pela convivência agradável.

Ao Prof. Roberto Pontarollo por todos os retornos durante os seminários e dedicação com que conduz o programa.

Ao Prof. Rilton pela atenção e incentivo a iniciar o mestrado.

À secretária do programa, Juliana, sempre solícita.

Ao botânico Gert Hatschbach e ao biólogo Osmar dos Santos Ribas, pela identificação botânica.

Ao programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) pela obtenção dos espectros de RMN.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro.

À todos os meus colegas de mestrado, em especial as amigas que dividiram a bancada comigo: Mariana Saragiotto, Luciane Dallarmi e Daniella Oliveira. Obrigada por terem feito parte dessa caminhada comigo!

Aos doutorandos Ranieri, Vinícius, Cris Paula, Beatriz e Gislene por terem me recebido de braços abertos, por todo o auxílio na execução desse trabalho. Rani, meu amigo, os agradecimentos são muitos. Obrigada por ter me despertado para o “start inicial”, me mostrado como o laboratório funciona, pelas aulas de HPLC, por todos os finais de semana que agente trabalhou junto, pelos cafezinhos e todas as inúmeras conversas dentro e fora do laboratório. Under pressure! Valeu pela parceria!

Aos meus amigos desde a graduação e pra vida, De, Gabs e Ju! Ju ainda quero trabalhar com você! De, amiga querida e irmã parceira, é gol!

À minha família pelo amor, vocês são peças fundamentais desse processo. Em especial, à minha mãe, Stela Maris, pelo esforço incondicional de me formar cidadã, pela educação e formação que me deu. Por toda a paciência, compreensão e companheirismo. Augusto Flávio, meu pai, que sempre me mostra o mundo através de uma perspectiva mais interessante, obrigada por acreditar e incentivar meu trabalho. Agradeço também ao meu “paidrasto”, Ednei, sempre presente, pelo incentivo, generosidade, conforto, segurança e paciência durante todos esses anos.

Ao meu porto seguro, meus avós, Elsa e Victor, antes de tudo pelo exemplo de integridade. Tenho o maior orgulho de ser a neta de vocês.

À minha querida irmã Isabel, a mulher mais corajosa que eu já conheci, por tudo que ela é pra mim. Bel, obrigada por ser minha amiga incondicional, por ter compartilhado comigo além do teto, as angustias e muitas alegrias durante esses dois anos. Obrigada pela atenção que você me deu quando aprendeu junto comigo, por ter conversado sobre os meus resultados, por me ajudar durante a preparação dos seminários, por ler meus projetos e artigos, por virar madrugadas comigo e por ter me aguentado de mal humor. Dá-lhe chimango! Sem você esse sonho não teria se tornado realidade. Amo você!!!

*“Cada dia que nasce é o primeiro para uns e será o último para outros e que,
para maioria, é só um dia a mais.”*
José Saramago

RESUMO

O gênero *Guettarda* é constituído por 150 espécies distribuídas em regiões tropicais. No Brasil as espécies do gênero encontram-se distribuídas pelo Cerrado e Mata Atlântica. Para o gênero *Guettarda* existem estudos biológicos indicando grande potencial farmacológico. Destaca-se a inexistência de estudos fitoquímicos e biológicos para a espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., conhecida popularmente como jasmim uruguaio. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o conhecimento da composição fitoquímica da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., assim como realizar um triagem de suas atividades biológicas. O estudo foi realizado a partir das cascas do caule, obtendo o extrato bruto etanólico, que ao ser particionado utilizando solventes em escala crescente de polaridade, gerou as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. A análise da fração diclorometano possibilitou, por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, propor a estrutura de dois triterpenos pentacíclicos. Os ensaios de toxicidade preliminar indicaram que o extrato bruto e as frações apresentam toxicidade, porém não interferiram na integridade da membrana dos eritrócitos. O ensaio de letalidade frente à náuplios de *Artemia salina* demonstrou que todas as frações, inclusive o extrato bruto, apresentaram algum grau de citotoxicidade, destacando-se a fração diclorometano que apresentou DL_{50} equivalente ao controle sulfato de quinidina. Os ensaios antioxidantes indicaram que a espécie possui alta capacidade antioxidante, destacando-se no ensaio de redução do fosfomolibdênio. A fração acetato de etila apresentou atividade antioxidante de 41,67% em relação ao padrão vitamina C e superou em 35,21% a atividade do padrão rutina. No ensaio de redução do radical DPPH, a fração acetato de etila apresentou um IC_{50} de 10,9122, valor próximo ao apresentado pelo padrão vitamina C ($IC_{50}=4,7780$) e rutina ($IC_{50}=6,6228$). No ensaio de TBARS foi possível concluir que tanto o extrato bruto (IA=71,48%) quanto a fração hexano (IA=47,85%) apresentaram índices superiores ao controle BHT (IA=42,675). A avaliação antimicrobiana indicou que, com exceção da bactéria *Escherichia coli*, foram sensíveis ao extrato e frações avaliadas os micro organismos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos por meio do ensaio alelopático sugerem que o extrato bruto e frações apresentam compostos aleloquímicos que atuam sobre o crescimento de sementes de *Lactuca sativa*.

Palavras-chave: *Guettarda uruguensis*; fitoquímica; atividades biológicas; triterpenos; plantas medicinais.

ABSTRACT

The *Guettarda* genus comprises 150 species distributed in tropical regions. In Brazil, the species of this genus are found in the Cerrado and Atlantic Forest. Whiting a short review, it was found many reports about biological activities indicating a high pharmacological potential for the genus *Guettarda*. We highlight the lack of phytochemical and biological studies for the specie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., popularly known as Jasmine Uruguayan. The present study aimed to contribute to the knowledge of the phytochemical composition of the specie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., as well as perform a screening of their potential biological activities. The ethanolic crude extract was obtained from the stem bark of the plant using a Soxhlet apparatus. Then this extract was fractioned trough partition system using a modified Soxhlet apparatus, giving the fractions: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and the remaining ethanolic. The study of the dichloromethane fraction has allowed, by chromatographic techniques and spectroscopic, to propose a structure of two pentacyclic triterpenes. The preliminary toxicity studies indicated that the crude extract and fractions exhibit toxicity, but did not affect the integrity of the erythrocytes membrane. The lethality assay of nauplii *Artemia salina* showed that all fractions, including crude extract, showed some degree of cytotoxicity, highlighting the dichloromethane fraction that showed LD₅₀ equivalent to the control, quinidine sulfate. The antioxidant assays indicated that the species has a high antioxidant capacity by the methods tested, especially in the reduction of the phosphomolybdenum. The ethyl acetate fraction showed that antioxidant activity of 41.67% compared to standard ascorbic acid and overcame by 35.21% the activity of standard rutin. On the DPPH radical reduction assay, the ethyl acetate fraction showed an IC₅₀ of 10.9122, which is close to the one presented for standard ascorbic acid (IC₅₀ = 4.7780) and rutin (IC₅₀ = 6.6228). In the TBARS assay was concluded that both the crude extract (IA = 71.48%) and the hexane fraction (IA = 47.85%) presented higher rates compared to the control, BHT (IA = 42.675). The antimicrobial evaluation indicated that, except for the bacterium *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* were sensitive to the extract and fractions evaluated. The results obtained by the test allelopathic suggest that the crude extract and fractions have allelochemicals that influence the growth of *L. sativa* seeds.

Key-words: *Guettarda uruguensis*; phytochemistry; biological activity; triterpenes; medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS BIOMAS BRASILEIROS	22
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO GUETTARDA	25
FIGURA 3 - ESPÉCIE <i>G. uruguensis</i>	32
FIGURA 4 - PRINCIPAIS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O CONTEÚDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	34
FIGURA 5 - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>G. uruguensis</i>	40
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA	62
FIGURA 7 - PARTICIONAMENTO DO EBETOH.....	66
FIGURA 8 - ETAPAS DO ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO DCM DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE <i>G. uruguensis</i>	68
FIGURA 9 - ÁCIDO URSÓLICO GLICOSILADO	70
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6	71
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6	72
FIGURA 12 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6 NA REGIÃO DE 12 A 66 ppm	73
FIGURA 13 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6 NA REGIÃO DE 70 a 190 ppm	74
FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE DEPT (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6.....	75
FIGURA 15 - ALDEIDO URSÓLICO	77
FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1EM DMSO- <i>d</i> 6	78
FIGURA 17 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1 EM DMSO- <i>d</i> 6 NA REGIÃO DE 72,10 A 37,35 ppm.....	79
FIGURA 18 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1 EM DMSO- <i>d</i> 6 NA REGIÃO DE 28,17 A 12,30 ppm.....	80

FIGURA 19 - REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	85
FIGURA 20 - FORMAÇÃO DO CROMÓFORO ROSA	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - USO ETNOMEDICINAL RELATADO PARA ESPÉCIES DO GÊNERO GUETTARDA.....	25
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	31
TABELA 3 - DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS.....	63
TABELA 4 - RESULTADO DO ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISES EM FITOQUÍMICA REALIZADO PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20%.	64
TABELA 5 - RESULTADO DO ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISES EM FITOQUÍMICA REALIZADO PARA O EXTRATO AQUOSO A 20%.	65
TABELA 6 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS ATRAVÉS DO PARTICIONAMENTO DO EBETOH.	66
TABELA 7 - DADOS DE RMN DE ^{13}C (δ PPM, 100 MHZ, DMSO- <i>d</i> ₆) PARA A SUBSTÂNCIA GU 1,A , ÁCIDO URSÓLICO (75,5 MHZ, C ₅ D ₅ N; MALHEIROS, 1995) E β -D-GLICOSE (HAMERSKI, 2005; DMSO- <i>d</i> ₆ , 500 MHZ)	76
TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^{13}C (δ PPM, 100 MHZ, CDCL ₃) PARA A SUBSTÂNCIA DCM_2A1, ALDEÍDO URSÓLICO (CDCL ₃ /DMSO <i>d</i> ₆ ; LEMES, 2011) E ÁCIDO URSÓLICO.....	81
TABELA 9 - RESULTADO DE IC ₅₀ PARA REDUÇÃO DO DPPH	82
TABELA 10 - ENSAIO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.....	84
TABELA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	89
TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS.....	90
TABELA 13 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA DIFUSÃO EM DISCO	93
TABELA 14- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA MIC.....	Erro! Indicador não definido.
TABELA 15 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA O EXTRATO BRUTO	96

TABELA 16 - CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA AO EXTRATO BRUTO DE <i>G. uruguensis</i>	97
TABELA 17 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO HEXANO	98
TABELA 18 - CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA A FRAÇÕES HEXANO DE <i>G. uruguensis</i>	99
TABELA 19 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO DICLOROMETANO.....	100
TABELA 20 - CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA A FRAÇÕES DICLOROMETANO DE <i>G. uruguensis</i>	100
TABELA 21 - FV OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	101
TABELA 22 - CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA A FRAÇÕES DICLOROMETANO DE <i>G. uruguensis</i>	102
TABELA 23 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE.....	103
TABELA 24 - CRESCIMENTO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA A FRAÇÕES DCM DE <i>G. uruguensis</i>	103
TABELA 25 - MÉDIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO	105
TABELA 26 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS	106
TABELA 27 - ANÁLISE DOS NÍVEIS DE DILUIÇÃO	106
TABELA 28 - ANÁLISE DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>L. sativa</i> SUBMETIDA AO EB E FRAÇÕES HEX, DCM, ACOET E HR DE <i>G. uruguensis</i>	107

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.	85
GRÁFICO 2-CURVA DO ÁCIDO ASCÓRBICOPELA REDUÇÃO DO DPPH..	86
GRÁFICO 3-CURVA DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	86
GRÁFICO 4-CURVA DO EBETOH PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	87
GRÁFICO 5-CURVA DA FHEX PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	87
GRÁFICO 6-CURVA DA FDCM PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	87
GRÁFICO 7-CURVA DA FACOET PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 8-CURVA DA FHR PELA REDUÇÃO DO DPPH.....	88
GRÁFICO 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS	91
GRÁFICO 10 - MÉDIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO...	105

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRELIMINAR	54
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Aspectos Gerais Sobre a Família Rubiaceae	21
2.1.2 Descrição Morfológica da Família Rubiaceae	21
2.1.3 Distribuição geográfica da Família Rubiaceae	21
2.1.4 Breve Descrição Química da Família Rubiaceae	22
2.1.5 Subfamília Cinchonoideae	24
2.2 GÊNERO GUETTARDA	24
2.2.1 <i>Guettarda acreana</i> (Krause)	26
2.2.2 <i>Guettarda angelica</i> Mart.	26
2.2.3 <i>Guettarda eximia</i> Baill.	27
2.2.4 <i>Guettarda grazielae</i> M.R.V. Barbosa	27
2.2.5 <i>Guettarda heterosepala</i> Guill.	27
2.2.6 <i>Guettarda macrantha</i> Benth.	28
2.2.7 <i>Guettarda noumeana</i> Baill.	28
2.2.8 <i>Guettarda ovalifolia</i> Urb.	28
2.2.9 <i>Guettarda platypoda</i> DC.	28
2.2.10 <i>Guettarda pohliana</i> Müll. ARG.	29
2.2.11 <i>Guettarda speciosa</i> L.	30
2.2.12 <i>Guettarda trimera</i> Guill.	30
2.2.13 <i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schltdl.	31
2.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO	33
2.3.1 Terpenos	35
2.3.1.1 Triterpenos	36
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5 MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	40
5.2 ENSAIOS FÍSICOS	41
5.2.1 Perda por dessecação	41
5.2.2 Cinzas Totais	42

5.2.3 Densidade Relativa	42
5.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA	42
5.3.1 Extrato Hidroalcoólico a 20 %	43
5.3.1.1 Pesquisa de Alcalóides	43
5.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas	44
5.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos	44
5.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas	45
5.3.1.5 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos	46
5.3.1.6 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos	46
5.3.2 Extrato Aquoso a 20%	47
5.3.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos	47
5.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos	47
5.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos	48
5.3.2.4 Pesquisa de taninos	48
5.3.2.5 Pesquisa de Aminogrupos	49
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO	49
5.5 PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO	50
5.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS	50
5.6.1 Cromatografia em coluna	50
5.6.2 Cromatografia em Camada Delgada	51
5.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	51
5.7 Ensaio Biológicos	52
5.7.1 Avaliação Toxicológica	52
5.7.1.1 Letalidade para Náuplios de <i>Artemia salina</i> Leach	52
5.7.1.2 Avaliação da Atividade Hemolítica	53
5.7.2 Avaliação da Atividade Antioxidante	55
5.7.2.1 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	55
5.7.2.2 Método do Sequestro de Radicais <i>2,2-difenil-1-picrilhidrazila</i>	56
5.7.2.3 Método de Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	57
5.7.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana	58
5.7.3.1 Micro-organismos	58
5.7.3.2 Método da Difusão em Disco	58
5.7.3.3 Concentração Inibitória Mínima	59
5.7.4 Avaliação da Atividade Alelopática	60
5.8 FLUXOGRAMA DA PESQUISA	61
6 RESULTADOS	63

6.1 DETERMINAÇÕES FÍSICAS	63
6.2 ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISES EM FITOQUÍMICA	63
6.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE <i>G. uruguensis</i>	65
6.4 ESTUDO DA FRAÇÃO DICLORMOETANO	67
6.4.1 DCM_1A	69
2 DCM_2A1	76
6.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	81
6.5.1 Teste de letalidade para náupilos de <i>Artemia salina</i> Leach.....	81
6.5.2 Avaliação Hemolítica	82
6.5.4 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	83
6.5.5 Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila	85
6.5.6 Método de Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico	89
6.5.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da Difusão em Disco.....	91
6.5.8 Concentração Inibitória Mínima.....	93
6.5.9 Avaliação da Atividade Alelopática.....	95
6.5.9.1 Avaliação do crescimento da radícula e hipocótilo	95
6.5.9.2 Avaliação do Índice de Velocidade de Germinação	104
7 CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para obtenção de substâncias bioativas é amplamente documentada ao longo do tempo. Civilizações primitivas consumiam as plantas como fontes de alimento e perceberam, de maneira empírica que se utilizadas no combate à doença, apresentavam potencial curativo. Até o século XIX, o uso de plantas e extratos vegetais com propriedades terapêuticas, era a forma mais comum de utilização de medicamentos (CUNHA, 2005; BARREIRO, 2007).

Há cerca de 3500 anos, civilizações Egípcias e Assírias deixaram legado em hieróglifos indicando o emprego terapêutico de fórmulas vegetais. (BARREIRO, 2001). Através de exploradores e de expedições navegantes, a humanidade teve contato com ervas, raízes e outras especiarias na forma de chás, essências, corantes e venenos (PINTO, 1995),

As primeiras substâncias puras do reino vegetal foram isoladas no século XVIII e após séculos de pesquisas em diferentes áreas, de contribuições provenientes do emprego de ^{14}C , de investigações biossintéticas e da introdução de métodos cromatográficos e espectroscópicos, os estudos das substâncias naturais expandiram aliados às ciências químicas, biológicas e farmacêuticas. Por meio destes, hoje é possível orientar a população no uso correto de produtos naturais, validar plantas medicinais como fitoterápicos, elucidar as substâncias ativas para obtenção de fármacos, dar suporte à classificação botânica das espécies vegetais e, ainda, fornecer modelos para síntese (PINTO, 2002).

350.000 a 550.000 é o número estimado de espécies no mundo, sendo que desse total, apenas de uma pequena parcela, 15 a 17%, foram realizados estudos fitoquímicos e biológicos (NODARI, 2007).

O Brasil possui um extenso território e uma imensa biodiversidade, abrigando cerca de 10% de toda a flora mundial, porém menos de 1% das espécies nativas foram estudadas através da ótica química e/ou farmacológica (DIAS, 2005; CUNHA, 2005).

Aproximadamente 84% dos fármacos disponíveis no mercado nacional são importados, contrastando com 23% da população que consome 60% de

todas as substâncias processadas. Ou seja, os medicamentos a base de plantas, ainda são a principal fonte de medicamento para a população brasileira de baixa renda (ELISABETSKY; WANNMCHER, 1983; ELISABETSKY, 1999) e mais recentemente uma tendência entre consumidores cada vez mais interessados na medicina preventiva (MAHADY, 2001).

Cabe ainda ressaltar que embora exista um vasto número de trabalhos científicos realizados sobre fitoterapia, esse ainda é um campo bastante produtivo para a comunidade científica e para a indústria farmacêutica, haja vista a diversidade de compostos bioativos encontrados nos vegetais (CALIXTO, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial confiam na medicina tradicional para cuidado primário de sua saúde e grande parte desta medicina tradicional envolve o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais ou seus princípios ativos (CRAGG, 1997).

Ressalta-se ainda que a família Rubiaceae apresenta inúmeras atividades biológicas, assim como o gênero *Guettarda*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais Sobre a Família Rubiaceae

A família Rubiaceae, descrita primeiramente por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim *rubium*, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (CRONQUIST, 1981).

Pertencente à ordem Gentinales (APG III, 2009), figura como a quarta maior família de Angiospermas. As rubiáceas dividem-se em três subfamílias sustentadas por caracteres moleculares: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. A subfamília Cinchonoideae é composta por seis tribos: Hamelieae, Chiococceae, Cinchoneae, Rondeletieae, Hillieae, Guettardeae (BREMER E ERIKSSON, 2009).

2.1.2 Descrição Morfológica da Família Rubiaceae

A caracterização de espécies pertencentes à família Rubiaceae pode ser realizada pela presença de algumas características entre elas a presença de flores tetracíclicas com corola actinomorfa (simetria radial, tetrâmeras ou pentâmeras, com estames em número igual ou menor que o número de pétalas, ovário ínfero, unilocular ou plurilocular e folhas opostas (MENDOZA *et al.*, 2004).

2.1.3 Distribuição geográfica da Família Rubiaceae

Devido a sua grande diversidade, a família Rubiaceae passou a ser um importante indicador ecológico e de preservação da vegetação tropical (DELPRETE E JARDIM, 2012).

As rubiáceas com 13100 espécies distribuídas em todas as regiões biogeográficas (MABBERLEY, 1997; GOVAERTZ *et al.*, 2007), sendo que 5000 espécies desse total ocorrem em regiões neotropicais (DELPRETE *et al.*, 2004).

No Brasil são catalogadas 1347 espécies e 118 gêneros (BARBOSA *et al.*, 2012) estando esses distribuídos pelos biomas: Bacia Amazônica, Cerrado, Caatinga, Restingas a Floresta Atlântica (FIGURA 1), (DELPRETE E JARDIM, 2012). Para a região Sul do país, são catalogadas 149 espécies distribuídas por 46 gêneros (DELPRETE *et al.*, 2004; DELPRETE *et al.*, 2005).

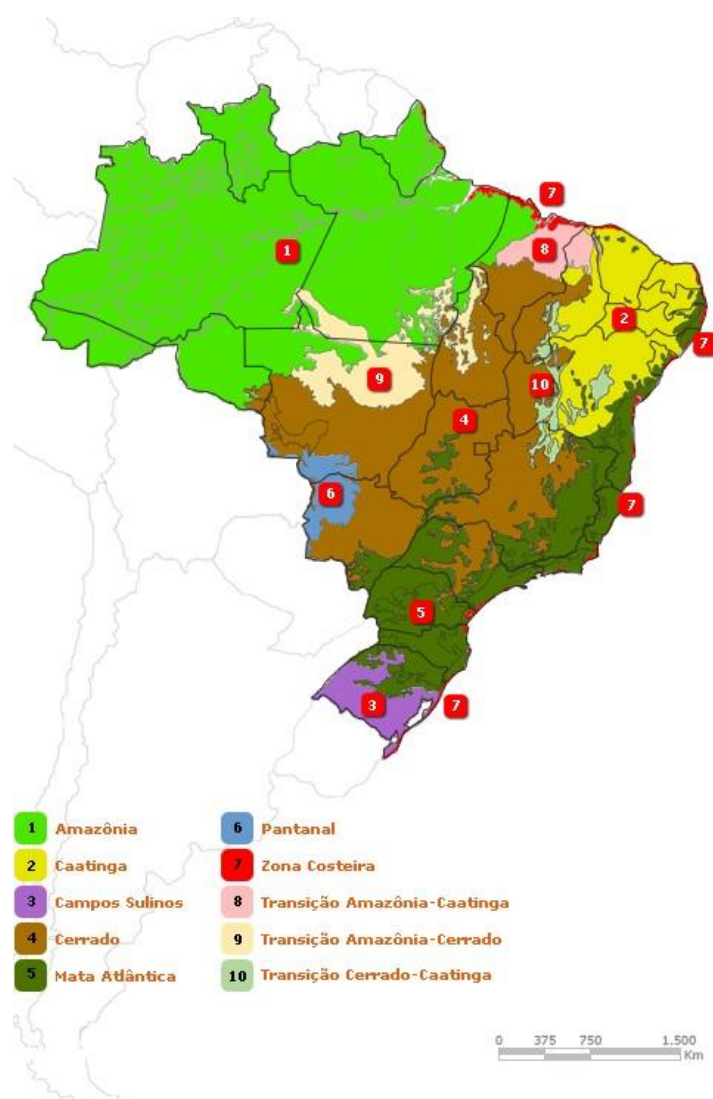


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DOS BIOMAS BRASILEIROS
 FONTE: www.wwf.org.br

2.1.4 Breve Descrição Química da Família Rubiaceae

Um levantamento bibliográfico sobre a constituição química da família Rubiaceae apresentou grande diversidade de classes de metabólitos secundários, dentre os quais se destacam os alcaloides dos tipos quinolínicos, indoloterpênicos, isoquinolínicos, piridínicos e piperidínicos (HENRIQUES *et al.*, 2003); iridoides (YOUNG *et al.*, 1992; OLEA *et al.*, 1997); triterpenos (BOLZANI *et al.*, 1991; BROCHINI *et al.*, 1994; OLEA *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 1998); flavonóides (OLEA *et al.*, 1997); saponinas (YOUNG *et al.*, 1998); quinonas (VERMES, WAGNER, 1980); lignóides; diterpenos (KOIKE *et al.*, 1980) e esteróides (NAGASAMPAGI *et al.*, 1971). Há, entretanto, que considerar que os relatos sobre a constituição química da família referem-se a espécies que representam uma centena dentre os mais de seiscentos gêneros incluídos na família. Este fato sugere que a família seja caracterizada por mais de um grupo biogenético.

A avaliação do perfil químico obtido para as subfamílias Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae revelam uma significativa relação da presença/ausência entre iridoides, alcaloides e antraquinonas. Na subfamília Ixoroideae, os iridoides são encontrados como os marcadores quimiotaxônicos, enquanto em Cinchonoideae, predominam os alcalóides indólicos e em Rubioideae, antraquinonas representam a principal classe de metabólitos secundários. Em Antirheoideae, não há ocorrência expressiva ou predominante de nenhum desses marcadores (TREVISAN, 1993; BOLZANI *et al.*, 1991).

Embora os iridoides sejam os marcadores quimiotaxônicos de Ixoroideae, eles também ocorrem nas demais subfamílias. Porém, segundo estudos de INOUE e COLABORADORES (1988), é possível classificar as subfamílias de Rubiaceae em três grupos, de acordo com a ocorrência exclusiva de diferentes iridoides glicosilados. A subfamília Ixoroideae é constituída por espécies que contêm os iridoides gardenosídeo, geniposídeo e ixorosídeo. Subfamília Rubioideae é constituída por espécies que contêm asperulosídeo e/ou ácido deacetilasperulosídeo. Enquanto que as subfamílias Cinchonoideae e Antirheoideae são constituídas por espécies que contêm loganina, secoiridoides e /ou alcaloides indólicos.

2.1.5 Subfamília Cinchonoideae

Cinchonoideae é a menor subfamília de rubiáceas, sendo representada por 120 gêneros. Compreendem arvoretas, sendo que muitas contêm alcaloides do tipo indol. O gênero mais conhecido é *Cinchona*, do qual se obtêm a quinina, a primeira cura efetiva contra a malária (MANNS *et al.*, 2010).

2.2 GÊNERO GUETTARDA

O gênero *Guettarda* é constituído por mais de 180 espécies incluindo árvores e arbustos, com distribuição pantropical (FIGURA 2). O gênero está inserido na família Rubiaceae, subfamília Antirheoideae, tribo Guettardeae. Para a região neotropical são relatadas 80 espécies distribuídas pelo México, América Central, Antilhas, Andes, Amazônia e Escudo da Guiana. Algumas espécies são encontradas no sudoeste do Pacífico e uma espécie está distribuída nas costas tropicais. Na Colômbia, são descritas 15 espécies distribuídas a partir do nível do mar até 2.800 m de altitude na região de Chocó, Caribe, Andina e da Amazônia (DELPRETE, 2002; ANDERSSON, 1992; MENDONZA, 2000).

No Brasil, as espécies do gênero *Guettarda* encontram-se distribuídas pelo Cerrado e Mata Atlântica (BARBOSA, 2010), sendo os principais representantes árvores ou arbustos (ACHILLE *et al.*, 2006; PEREIRA E BARBOSA, 2004).

Estudos etnofarmacológicos (TABELA 1) apontam que espécies do gênero possuem uso popular diverso na América do Sul (CAPASSO *et al.*, 1998; IPMEB, 1979; ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; BHATTCHARYYA & ALMEIDA, 1985) e África (KAOU *et al.*, 2008).

Estudos farmacológicos indicam atividade antiespasmódica (CAPASSO *et al.*, 1998), hipoglicemiante (TAVARES, Z. M.; SOUZA, M. P.; 1979) anti-inflamatória (ALMEIDA, 1982; TESTA, *et al.*, 2012), antimicrobiana (BISPO *et al.*, 2007), antifúngica (THAMIZHVANAN, 2010), larvicida (MOURA *et al.*, 2006), antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2008), antiviral (BARROS *et al.*, 2007),

antidiarreico (GANDHIMATHI, 2009) e antiepilético (SARAVANA KUMAR, 2009).

Estudos químicos indicaram a presença de alcaloides, triterpenos, saponinas triterpênicas, iridoides, secoiridoides, derivados do ácido quínico e o ácido chiquímico (LIMA, 2009).

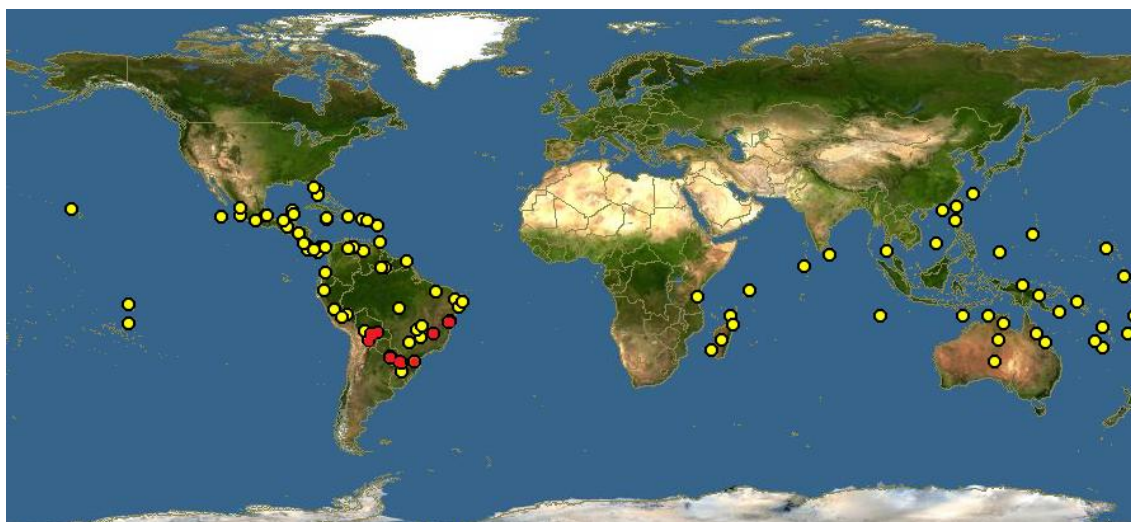


FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO GÊNERO GUETTARDA

FONTE: Adaptado de <http://www.discoverlife.org/>

NOTA: pontos amarelos: diversas espécies pertencentes ao gênero Guettarda; pontos vermelhos: espécie *Guettarda uruguensis*.

TABELA 1 - USO ETNOMEDICINAL RELATADO PARA ESPÉCIES DO GÊNERO GUETTARDA.

ESPÉCIE	USO ETNOMEDICINAL	REFERÊNCIA
<i>G. acreana</i>	Anti-inflamatória, antiespasmódica	CAPASSO <i>et al.</i> , 1998
	Hipoglicemiante, tifo, diarreia, febre	IPMEB, 1979
<i>G. angelica</i>	Cólica menstrual, constipação, febre	ALBUQUERQUE <i>et al.</i> , 2007
	Diabetes, hepatite	FERREIRA, 2009
<i>G. macrantha</i>	Enxaqueca	GRANAND, 1987
<i>G. platyphoda</i>	Febrífuga, pós-parto	AGRA, 1980
	Antidiarreico	KAOU, 2008; WEINER, 1971; WEINER, 1984
<i>G. speciosa</i>	Disenteria, febre, antiepilético, tosse, resfriado e dor de garganta	WEINER, 1971; WEINER, 1984
	Reumatismo, dor pélvica e malária	KAOU, 2008

2.2.1 *Guettarda acreana* (Krause)

Guettarda acreana é uma espécie conhecida popularmente na Guiana por yaki, eekwa e chuwirikia. Estudos étnicos relatam que as cascas do caule possuem um potente alcaloide utilizado por ameríndios da Guiana no preparo de um curare utilizado como veneno em suas flechas. (FANSHAW, 1950; MENNEGA, 1988; JOHNTON, 1996). CAPASSO *et al.*, (1998) cita o uso popular na Bolívia com finalidade anti-inflamatória e antiespasmódica, e avalia o efeito antiespasmódico do extrato, frações e substâncias isoladas frente ao íleo isolado de cobaias, sendo isolados os triterpenos: ácido 3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopirasilquinóvico, ácido 3-O- β -D-fucopiranosilquinóvico, quinovato de 3-O- β -D-fucopiranosil-(27 \rightarrow 1)- β -D-glicopirasil, além de oito substâncias que apresentaram efeito antiespasmódico, sendo elas os alcaloides: ácido strictosidínico, strictosidina, ácido lialosílico, 5 α -caboxistrictosidina e sikingina; derivados do ácido quínico: ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico e o ácido chiquímico. O extrato CHCl₃/MeOH (9:1), extrato metanólico e a fração solúvel em metanol do extrato CHCl₃/MeOH também foram capazes de produzir efeito antiespasmódico no modelo avaliado.

2.2.2 *Guettarda angelica* Mart.

Guettarda angelica é uma espécie nativa da região Nordeste do Brasil conhecida popularmente como angélica do mato (IPMEB, 1979). Utilizada na medicina popular como hipoglicemiante (BRAGA, 1976), no tratamento da tifo, diarreia (IPMEB, 1979), cólica menstrual, constipação (Albuquerque *et al.*, 2007) febre (IPMEB, 1979; ALBUQUERQUE ET AL., 2007), diabetes e hepatite (FERREIRA, 2009).

O extrato aquoso demonstrou atividade hipoglicemiante (TAVARES, Z. M.; SOUZA, M. P.; 1979). Os extratos metanólico e aquoso obtido das cascas das raízes demonstraram atividade antibacteriana *in vitro* contra bactérias gram positivas (BISPO *et al.*, 2007). O extrato aquoso das sementes apresentou atividade antiviral contra o herpes vírus bovino e suíno tipo I (BARROS *et al.*,

2007). Dando continuidade ao estudo antiviral BARROS *et al.*, (2010) determinam o mecanismo de ação antiviral do extrato aquoso das sementes.

Um único estudo químico descreve o isolamento dos triterpenos: ácido quinóico, ácido 3-O- β -D-glicopiranosilquinóico, ácido rotúndico, hederagina e ácido 3 β ,23-diidroxiurs-12-em-28-óico (MATOS *et al.*, 1986).

2.2.3 *Guettarda eximia* Baill.

Para a espécie *Guettarda eximia* existe apenas um estudo químico realizado por KAN-FAN & HUSSON (1979) identificando no extrato das folhas os alcaloides: 4,21-dehidrogeissoschizina, catenamina e 17-Hidroxycatenamina.

2.2.4 *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa

Guettarda grazielae é uma espécie classificada como árvore ou arvoreta, florescendo de fevereiro a maio e frutificando de maio a julho (PEREIRA E BARBOSA, 2004). Ocorre em pequena concentração no sub-bosque de remanescentes de Mata Atlântica no litoral da Paraíba (BARBOSA, 1996). Segundo MOURA *et al.*, (2010) em triagem realizada utilizando 94 extratos de dez espécies nativas da região Nordeste, a espécie *G. grazielae* apresentou potencial atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*.

Foram isolados e identificados para essa espécie os triterpenos: ácido 3-O- β -D-glicopiranosilquinóico, (MOURA, 2006; LIMA *et al.*, 2009), 3- β -O- β -D-glicopiranosilquinóico, acetato de α -amirina, cicloartenona, 3 β -19 α ,23-triidroxiurs-12-eno, ácido ursólico, 3 β -6 β -19 α ,23-tetraidroxi-urs-12-em-28-óico (LIMA *et al.*, 2009); o iridóide: guettarddodiol; o secoiridóide: serracenina e o fitoesteróide: B-sitosterol (MOURA, 2006).

2.2.5 *Guettarda heterosepala* Guill.

Para a espécie *Guettarda heterossepala* existem apenas dois estudos químicos identificando um alcaloide indólico como guettardina (BRILLANCEAU *et al.*, 1984) e outros dois alcaloides presentes nas folhas, a antirhina e a 3-epi-antirhina (KAN-FAN *et al.*, 1986).

2.2.6 *Guettarda macrantha* Benth

Guettarda macrantha é uma espécie utilizada na forma de chá para o alívio de enxaquecas na medicina popular da Guiana Francesa (GRENAND, 1987).

2.2.7 *Guettarda noumeana* Baill.

MONTAGNAC *et al.*, (1997) realizou estudo químico que resultou no isolamento e identificação dos alcaloides: cupreína, diidrocupreína, *N*-Metilquinicinol e *N*-Metildiidroquinicinol.

2.2.8 *Guettarda ovalifolia* Urb.

Guettarda ovalifolia é uma espécie classificada como arvoreta encontrada no Caribe (LIOGIER, H. A., MARTORELL, L. F; 1982). JIANG *et al.*, (1994) descreve a partir do extrato metanólico das raízes o isolamento dos alcaloides 3 α , 5 α -tetrahidrodeoxicordifolia e 5 α -carboxi-strictosidina.

2.2.9 *Guettarda platypoda* DC.

Guettarda platypoda é uma espécie conhecida popularmente como angélica, angélica do mato e angélica da praia (LIMA *et al.*, 2009). Possui hábito arbustivo e distribuição neotropical (PEREIRA & BARBOSA, 2004; ANDERSSON, 1992). No Brasil cresce próxima a planície litorânea,

principalmente no Nordeste. Floresce e frutifica praticamente todos os meses do ano (PEREIRA & BARBOSA, 2004).

Utilizada popularmente como febrífuga e no pós-parto (AGRA, 1980). Em triagem farmacológica ALMEIDA (1982) avalia como considerável a atividade anti-inflamatória exibida pelo extrato preparado a partir das cascas das raízes.

BHATTCHARYYA & ALMEIDA (1985) isolaram ácido quinóico, ácido rotundico, β -sitosterol e uma saponina. FERRARI *et al.*, (1986) isolou o ácido 3-O- *B-D*-fucopiranosilquinóico, marronosídeo, swerosídeo, 5 α -carboxietrictosidina, além do ácido quinóico que já havia sido descrito anteriormente por BHATTCHARYYA & ALMEIDA (1985). AQUINO *et al.*, (1988) descreve o isolamento de três iridoides: ácido logânico, loganina e marronosídeo; e dois secoiridoides: secoxiloganina e swerosídeo. No mesmo ano AQUINO *et al.*, (1988) descreve além do isolamento do ácido logânico, loganina e secoxiloganina, o isolamento de quinovato de 3-O- β -D-glicopiranosil(27 \rightarrow 1)- β -D -glicopiranosila e quinovato de 3-O- β -D-glicopiranosil(28 \rightarrow 1)- β -D -glicopiranosila.

2.2.10 *Guettarda pohliana* Müll. ARG.

Guettarda pohliana é uma espécie conhecida popularmente como angélica do mato. Estudos indicaram potencial atividade antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2008) e anti-inflamatória (ARRUDA *et al.*, 2008; TESTA, *et al.*, 2012).

Para essa espécie foram isoladas as saponinas triterpênicas: 28-O- β -D-glicopiranosilquinóico, 3-O- β -D-glicopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosilquinóico, 3-O- β -D-quinovopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosilquinóico, 3-O- β -D-glicopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosilcinchólico; o derivado do ácido clorogênico: ácido quinóico; o esteroide glicosilado: ácido 4,5-O-dicafeoilquínico (OLIVEIRA *et al.*, 2008); daucosterol (OLIVEIRA *et al.*, 2008; TESTA *et al.*, 2012); os triterpenos: ácidos ursólico, oleanóico (TESTA *et al.*, 2012), pomólico, rotúndico, 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetra-hidroxiurs-12-en-28-oico e

elétrico; o isoprenoide: loliolida,; o ácido 5-O-cafeoilquínico e o secoiridoide: secoxiloganina (TESTA *et al.*, 2012).

2.2.11 *Guettarda speciosa* L.

Guettarda speciosa é uma espécie conhecida popularmente como gardênia da praia. Diferente de outras espécies do gênero, a *G. speciosa* não possui distribuição Neotropical e sim Pantropical (HATUSIMA, 1975), sendo comumente encontrada pelo litoral, falésias e florestas de baixa e alta altitude.

Utilizada popularmente em muitas patologias e no alívio de diversos sintomas: antidiarreico (KAOU, 2008; WEINER, 1971; WEINER, 1984), disenteria, febrifugal, antiepilético, tosse, resfriado e dor de garganta (WEINER, 1971; WEINER, 1984), reumatismo, dor pélvica e malária (KAOU, 2008).

KAOU (2008) realizou uma pesquisa etnofarmacológica e avaliou a atividade antimalárica da espécie *G. speciosa* descrita popularmente, porém no modelo testado o extrato não foi capaz de produzir efeito antiplasmódico.

Em estudo farmacológico GANDHIMATHI (2009) demonstra que o extrato etanólico da entrecasca produz um considerável efeito antidiarreico, podendo, portanto vir a ser uma futura opção terapêutica, comprovando desse modo o uso popular. SARAVANAKUMAR (2009) demonstra que o extrato da entrecasca possui propriedades antiepiléticas, sugerindo em estudo posterior (SARAVANAKUMAR, 2009) que esse efeito esteja relacionado à restauração dos níveis normais de monoaminas. THAMIZHVANAN (2010) avalia como potente a capacidade antibacteriana e antifúngica da espécie.

Estudos químicos relatam o isolamento do ácido logânico, secologanina (INOUE, 1988), loganina (YAGA & KAZUHIKO, 1985), quinovle glycosid C, eedysome, swerosídeo, marronosídeo, icariside D1, glicerol glucoronide derivative, megamastigmane glycoside (CAI, 2011).

2.2.12 *Guettarda trimera* Guill

Para a espécie *Guettarda trimera* KAN-FAN (1985) descreve o isolamento de três alcaloides: *N*-Metildiidroquinicina, *N*-Metildiidroquinicinol e 9-Epi-*N*-Metildiidroquinicinol.

2.2.13 *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl.

A classificação taxonômica da espécie *G. uruguensis* é apresentada na TABELA 2.

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

TÁXON	BREMER, 2009
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentinales
Família	RubiaceaeE
Subfamília	Cinchonoideae
Tribo	Guettardeae
Espécie	<i>Guettarda uruguensis</i>

Guettarda uruguensis (FIGURA 3) espécie conhecida popularmente como jasmim do Uruguai (FAO, 1993), não apresenta descrição em literatura sobre sua composição fitoquímica.

Com relação as suas atividades biológicas, KELMER (2011) avalia o perfil de susceptibilidade antimicrobiana onde foi observado para o extrato bruto atividade frente às bactérias *S. aureus* (CIM 1000 µg/mL) e *E. coli* (CIM 500 µg/mL). As frações diclorometano e hidroalcoólica apresentaram ação frente a *S. aureus* (CIM 1000 µg/mL). Nos bioensaios de atividade antifúngica foi observado que apenas a fração diclorometano mostrou-se ativa frente à levedura *C. albicans* (CIM de 500 µg/mL).

Com relação aos dados botânicos e ecológicos a espécie é classificada como árvore de 4 a 7 m de altura, dotada de copa piramidal ou arredondada. Tronco curto e cilíndrico, revestido por casca fina e quase lisa, de 15 a 25 cm

de diâmetro. As folhas são simples, opostas cruzadas, membranáceas, face superior pubescente e inferior alvo-tormentosa, de 11 a 16 cm de comprimento por 7 a 11 cm de largura, sobre pecíolo de 1 a 6 cm de comprimento. Inflorescências em cimeiras longo-pedunculadas (6 a 9 cm de comprimento), com 10 a 30 flores de cor creme ou esbranquiçada. Fruto drupa globosa de superfície rugosa, contendo uma única semente. Planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófita, secundária, característica e exclusiva dos cerrados e das matas semidecíduas da bacia do Paraná e de altitude. Planta de distribuição muito irregular e descontínua ao longo de sua área de dispersão, podendo ocorrer em população quase pura em alguns locais, ser muito rara em terrenos de encostas suaves, com solos de boa fertilidade e bem drenados, tanto em formações primárias como secundárias. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis. (LORENZI, 1992).



FIGURA 3 - ESPÉCIE *G. uruguensis*

FONTE: GIEHL, 2012

NOTA: A: INFLORESCÊNCIAS; B: FRUTOS; C: ASPECTO GERAL.

2.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Entende-se por metabolismo o conjunto de reações químicas que ocorrem nas células. Os compostos químicos são formados, degradados ou transformados pela ação de enzimas específicas estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas.

Os processos metabólicos podem ser divididos em dois conjuntos, primário e o secundário. Metabolismo primário corresponde a um conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, como por exemplo, a fotossíntese, respiração e o transporte de solutos, possuindo distribuição universal nas plantas, como os aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e a clorofila (LENHINGER *et al.*, 2002).

O metabolismo secundário origina compostos que não são considerados essenciais, porém garantem vantagem para a sobrevivência da planta (SIMÕES *et al.*, 2004). Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto sua produção é associada à defesa da planta contra herbivoria, ataque de patógenos, radiação solar (MONTANARI Jr., 2002), ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e micro-organismos simbiontes (PERES, 2008) e na alelopatia (SANTOS, 2002). A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada por diversos fatores ambientais (FIGURA 4, p.30), por representarem uma interface química entre as plantas e o meio ambiente (KUTCHAN, 2001).



FIGURA 4 - PRINCIPAIS FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR O CONTEÚDO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS
 FONTE: GOBBO-NETO e LOPES, 2007

Pelo fato de possuírem estruturas diversificadas, Uma das consequências práticas dessa diversidade é o fato de que esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos, como a quimiosistemática, por representarem a expressão da individualidade das espécies (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários possuem interessantes propriedades biológicas comercialmente importantes para os setores alimentício, agrônômico e farmacêutico, o qual visa principalmente o grande número de substâncias farmacologicamente ativas, porém a função da maioria dos compostos e suas funções ainda não são conhecidas (DEWICK, 2009; SANTOS, 2002).

Embora pouco conhecido, o vasto campo de atuação desses metabólitos pode contribuir na busca de soluções sustentáveis aos vários problemas enfrentados na atualidade, como por exemplo, a resistência microbiana e o uso indiscriminado de inseticidas.

Os metabólitos secundários originam-se do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2002). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos derivam do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos

fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2008).

2.3.1 Terpenos

O maior grupo de metabólitos secundários presente no reino vegetal é o grupo dos terpenos, dos quais já foram isoladas aproximadamente 30.000 substâncias. Número muito superior ao de qualquer outro grupo de derivado de produtos naturais.

Os terpenos distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores, sendo também encontrados em menor quantidade em fungos e organismos marinhos.

Os terpenos de origem vegetal desempenham funções importantes como defesa, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais, além de funcionarem como moléculas de sinalização (VEERPOTE, 2000).

Os terpenos são formados a partir de duas vias de biossíntese: a via do mevalonato, responsável pela formação dos sesquiterpenos (C15) e triterpenos (C30), que ocorre no citosol e cujos precursores são piruvato e acetil-coenzima A; e a via alternativa, conhecida como via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos (C10), diterpenos (C20) e tetraterpenos (C40) e ocorre nos plastídeos e cujos precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato. Em ambas as vias, há a formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), com 5 carbonos, que é convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), através da enzima IPP isomerase, iniciando a formação dos terpenos. Para a formação dos monoterpenos (C10), uma unidade de IPP é adicionada a uma de DMAPP, por meio de uma preniltransferase, formando o seu precursor difosfato de geranila (GPP), com dez carbonos. A adição de uma unidade de IPP ao GPP, através de uma preniltransferase, forma o difosfato de farnesila (FPP), com 15 carbonos, a partir do qual se formam os sesquiterpenos (C15). A adição de uma unidade de

IPP ao FPP, por sua vez, forma o difosfato de geranilgeranila (GGPP), com 20 carbonos, que dá origem aos diterpenos (C₂₀). Os demais terpenos são formados da mesma forma, por adição de uma unidade de IPP aos seus respectivos precursores. (VERPOORTE, 2000)

2.3.1.1 Triterpenos

Espécies do gênero *Guettarda* são conhecidas por serem ricas fontes de triterpenos pentacíclicos, especialmente do tipo oleanano e ursano (LIMA, 2009).

Os triterpenos constituem um vasto e diverso grupo de compostos naturais, conhecendo-se mais de 4000 triterpenos, com mais de 40 esqueletos diferentes (DEY *et al*, 1991). A chave para a elucidação da sua biossíntese consistiu na descoberta de que o seu precursor, o esqualeno, era constituído por duas unidades farnesil, unidas segundo um mecanismo cauda cauda, ao invés do mecanismo cabeça-cauda típico dos terpenos mais simples (Mann, 1994).

Duas moléculas de farnesil PP são unidas cauda-cauda para produzir o hidrocarboneto esqualeno, via pré-esqualeno PP. A ciclização do esqualeno é via intermediário 2,3 óxido de esqualeno, produzido numa reação com O₂ e NADPH. O óxido de esqualeno, na conformação cadeira-cadeira-cadeira-barco leva à formação do cátion damarenil. Através de rearranjo Wagner-Meerwein, um anel de seis membros é criado, em contrapartida, a formação de carbocátion secundário, levando a obtenção do cátion bacarenil. A partir deste, formação de anéis, migração de metilas ou hidretos e a perda de próton, levam a formação dos triterpenos lupeol, α -amirina, β -amirina, taraxasterol e germanicol.

O espectro de RMN ¹H de triterpenos é bem característico, exibindo entre a região 3 a 1 ppm sinais intensos originados dos grupos metila e metilênicos. A região entre 1,20 e 0,70 ppm apresenta sinais para os hidrogênio das metilas (simpletos a 0,73 e 1,20 ppm para metilas em C-18 e C-19 e dubletos em 0,89 e 0,87 ppm para metilas em C-21 e C-26). Metilas em C-

4 originam simpletos entre 0,8 e 0,9 ppm. Hidroxila em C-3 origina multipletos em 3,5 ppm.

Dentro da ampla variedade de triterpenos, existe uma quantidade significativa deles que pode ser considerado de estrutura simples, que apresenta como característica comum uma única ligação dupla, e apenas um grupo funcional oxigenado no C-3, ou neste carbono e em algum dos grupos metilas. O espectro de RMN ^{13}C apresenta deslocamentos entre 12-24 ppm para C primário, 20-41 ppm para C secundário, 35-57 ppm para C terciário, 27-43 ppm para C quartenário, 65-91 para C contendo hidroxila, 119-172 para C olefínico e 177-220 para C carbonílico (UGAZ, 1994).

Frequentemente os triterpenos ocorrem numa mesma espécie, formando misturas complexas. Em função da semelhança estrutural, esses triterpenos apresentam um comportamento cromatográfico muito semelhante, dificultando o isolamento e a posterior identificação dos constituintes da mistura.

O emprego de técnicas de RMN de ^{13}C , como a obtenção de um espectro totalmente desacoplado e das sequências de DEPT 90° e 135°, permite a identificação dos componentes de misturas de triterpenos simples com a mesma funcionalização, através da comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C obtidos, com os descritos na literatura, especialmente dos átomos de carbono que sustentam a ligação dupla, por serem característicos em alguns tipos de esqueletos (OLEA *et al.*, 1990).

Os triterpenos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Algumas plantas contêm grande quantidade deles no látex e na resina e a função fisiológica desses compostos, acredita-se ser de defesa química contra patógenos e herbívoros. Possuem atividades biológicas bem caracterizadas, incluindo os esteroides e as saponinas, exibindo mais de 100 esqueletos distintos (XU *et al.*, 2004). No âmbito dos seres humanos e animais, há relatos de atividades antitumorais, anticancerígena, além de atividades antiviral e antibacteriana (MAHATO, SEN, 1997).

3. JUSTIFICATIVA

Relatos sobre os constituintes químicos da família Rubiaceae indicam uma grande diversidade de metabólitos secundários, tais como iridoides, alcaloides, antraquinonas, flavonoides, derivados fenólicos, triterpenos e diterpenos. Poucos estudos químicos do gênero *Guettarda* têm sido relatados, apesar da evidência de que a família Rubiaceae representa uma fonte rica de micromoléculas. O levantamento bibliográfico realizado demonstra que o gênero *Guettarda* possui espécies utilizadas na medicina popular e grande potencial farmacológico, porém, não foram encontradas descrições químicas nem tampouco biológicas sobre a *Guettarda uruguensis*, espécie nativa, conhecida popularmente como jasmim uruguaio e/ou veludinho.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma prospecção fitoquímica e avaliar o potencial antioxidante, toxicológico, antimicrobiano e alelopático do extrato e frações das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltdl., Rubiaceae

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar o material vegetal
- Obter o extrato bruto etanólico
- Particionar o extrato bruto etanólico utilizando escala de polaridade crescente
- Isolar constituintes químicos presentes na fração diclorometano utilizando técnicas cromatográficas
- Identificar os constituintes químicos isolados utilizando técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C
- Avaliar a toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas a partir do extrato etanólico
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato e frações obtidas a partir do extrato etanólico
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e frações obtidas a partir do extrato etanólico
- Avaliar a atividade alelopática do extrato e frações obtidas a partir do extrato etanólico

A partir do material vegetal coletado foi realizada a triagem através da separação manual das cascas do caule, que posteriormente foram secas à temperatura de aproximadamente 30°C e trituradas em moinho de facas. Na sequência foi realizada a pesagem e o armazenamento do material vegetal obtido.

5.2 ENSAIOS FÍSICOS

A fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para o material vegetal, foram realizadas determinações de perda por dessecação, teor de cinzas totais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), com modificações. e densidade relativa (LACHMAN, 2001).

5.2.1 Perda por dessecação

O ensaio de determinação da perda por dessecação pelo método gravimétrico se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia.

Cerca de 1g das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* foram transferidas para cadinho de porcelana, previamente dessecado e tarado, e levado à estufa a 105°C. Decorridas duas horas, foram transferidos para dessecador provido de sílica e pesados após 30 minutos. A secagem e o resfriamento foram repetidos até que a amostra apresentasse peso constante. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação 1:

$$\frac{(P_u - P_s)}{P_a} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

P_u : peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação;

P_a : peso da amostra;

P_s : peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

5.2.2 Cinzas Totais

O ensaio de determinação de cinzas totais se destina a determinar o teor de sais minerais ou matéria inorgânica do vegetal. Porém deve-se observar que o resíduo pode ser constituído por cinzas fisiológicas (derivadas do tecido vegetal) e cinzas não fisiológicas (impurezas inorgânicas não voláteis presentes como contaminantes).

Cerca de 1g das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* foram transferidos para cadinhos de porcelana previamente calcinados, arrefecidos e pesados. As amostras foram incineradas a 600°C. Após essa etapa foram calculadas as percentagens de cinzas em relação ao material vegetal seco. O ensaio foi realizado em sextuplicata.

5.2.3 Densidade Relativa

Para o ensaio de determinação da densidade bruta foi utilizado o método da proveta, onde, o pó das cascas do caule da espécie *G. uruguensis*, foi transferido para uma proveta de 25 mL, com peso conhecido, até completar o volume de 15 mL. Durante a transferência foram removidas as partículas de ar que estavam presentes entre o pó da planta. Em seguida, a proveta contendo o pó foi pesada, e pela diferença de pesos, foi obtida a quantidade de pó contido na proveta. Com essas informações, o peso do pó dividido pelo volume (15 mL), foi calculado a densidade. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

O ensaio sistemático para análise em fitoquímica tem por objetivo detectar os seguintes metabólitos secundários: alcaloides, flavonoides,

leucoantocianidinas, cumarinas, antraquinonas, esteroides, triterpenos, heterosídeos, taninos e aminogrupos. O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (MOREIRA, 1979, p. 3-19) e adaptada por Miguel (2003).

5.3.1 Extrato Hidroalcoólico a 20 %

O extrato hidroalcoólico a 20 % foi preparado por maceração de 40 g de material vegetal seco e estabilizado em 200 mL de álcool etílico a 70 % v/v, em banho-maria a 60 °C por 1 hora. Na sequência, o extrato foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotaevaporador a um terço do volume inicial. O fracionamento sequencial do extrato foi realizado com os solventes orgânicos: hexano, clorofórmio e acetato de etila, nesta ordem de polaridade. Desta maneira, efetuou-se a agitação por 10 vezes com volumes de 20 ml de cada solvente em funil de separação. As porções resultantes tiveram seus volumes completados para 200 ml com os solventes que constituíram aquelas. O resíduo do extrato remanescente teve seu volume completado para 200 ml com etanol.

5.3.1.1 Pesquisa de Alcalóides

Uma alíquota de 50 mL de cada fração foi evaporada à secura; o resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol mais 20 mL de ácido clorídrico 1 %. Esta solução foi transferida para cinco tubos de ensaio em frações 1 mL, com os quais foi realizada a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais.

- Reativo de Mayer: precipitado branco ou turvação branca indicam resultado positivo.
- Reativo de Dragendorff: precipitado de cor vermelho-tijolo indica reação positiva.
- Reativo de Bouchardat: formação de precipitado alaranjado indica reação positiva.

- Reativo de Bertrand: precipitado branco ou turvação branca indicam resultado positivo.

Foram realizados testes para confirmação dos resultados: os 15 mL restantes da fração foram transferidos para funil de separação e alcalinizados a pH 10 com hidróxido de amônio. A fração orgânica foi reunida e levada à secura em banho-maria a 60 °C (para a fração hidroalcoólica remanescente foi realizada extração com duas vezes de 15 mL de uma mistura de éter: clorofórmio (3:1)). A este resíduo foram adicionados 1 mL de álcool etílico e 5 mL de solução de ácido clorídrico a 1%; a solução foi aquecida levemente e dividida em cinco tubos de ensaio em frações de 1 mL; a pesquisa de alcalóides com reativos gerais foi repetida.

No caso de reação positiva foi adicionado, lentamente, com agitação, 2 mL de solução etanólica de ácido tartárico a 5 %. Caso a reação seja realmente positiva para alcalóides, o precipitado deve ser dissolvido.

5.3.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

Foram transferidos para béquer 10 mL de cada fração, aos quais foram adicionadas cinco gotas de ácido clorídrico concentrado. O material foi levado à ebulição. Em caso de desenvolvimento de coloração vermelha, a reação foi considerada positiva para leucoantocianidinas.

5.3.1.3 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos

Foram transferidos para tubo de ensaio 5 mL de cada fração. Adicionaram-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas, violácea indica a presença de flavanonas e vermelha indica a presença de flavonóis. Esta técnica apresenta uma limitação: as chalconas, as auronas e as isoflavonas não desenvolvem coloração, porém algumas chalconas em meio ácido produzem flavanonas.

a) Teste do Oxálico Bórico ou Reação de Taubock

Foram transferidos para cápsula de porcelana, 10 mL das frações e levados ao banho-maria até secura. Ao resíduo foram adicionadas cinco gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1). Agitar e levar à secura; ao resíduo adicionar éter etílico. A presença de fluorescência sobre radiação ultravioleta indica reação positiva. Em geral, os flavonóis apresentam fluorescência amarelo esverdeada, enquanto as flavanonas e isoflavanonas não apresentam esta propriedade; antociâncios apresentam cor, mas não produzem fluorescência.

b) Ensaio de Pacheco

Cerca de 10 mL das frações foram transferidas para cápsula de porcelana e levadas ao banho-maria até secura. O resíduo foi aquecido em fogareiro e alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético foram adicionados. Em seguida, 0,1 mL de ácido clorídrico concentrado foram adicionados. A produção de coloração roxa indica a presença de dihidroflavonóis.

c) Ensaio de Zinco em Ácido Clorídrico

Em um béquer (em banho de gelo) com 5 mL da fração foi adicionada uma pastilha de zinco e gotas de ácido clorídrico fumegante, cuidadosamente. A produção de coloração violeta indica presença de dihidroflavonóis. Flavanonas e flavanol não produzem coloração.

5.3.1.4 Pesquisa de Cumarinas

Foram transferidos para um béquer 50 mL da fração e foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico N; o volume foi reduzido a 10 mL em banho-maria a 60 °C. Ao resíduo foram adicionados 5 mL de água deionizada. No caso da fração hidroalcoólica remanescente foi necessário fazer extração em funil de separação com três porções de 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi reduzida a 5 mL em banho-maria a 60 °C. Em papel de filtro demarcado, foram colocadas três gotas do extrato orgânico, de modo que se formaram três manchas no papel. Depois de seco, foi adicionada uma gota de

hidróxido de sódio N sobre as manchas 1 e 2. A mancha 2 foi encoberta por uma moeda; após observação do papel sob luz ultravioleta em ondas longas, a presença de fluorescência cor azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

Em um tubo de ensaio com 5 mL do extrato orgânico foram adicionados 2mL de hidróxido de amônio SR, agitando. Após observação sob luz ultravioleta, a presença de fluorescência de azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

5.3.1.5 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Em um balão de fundo chato de 100 mL foram transferidos 30 mL da fração e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado, ainda quente, por papel de filtro; ao filtrado foram adicionados 30 mL de água deionizada (para a fração remanescente, foi realizada extração com duas vezes de 10 mL de éter etílico em funil de separação). A fase orgânica foi separada e concentrada a 5 mL em banho-maria a 60 °C; os 5 mL foram transferidos para tubo de ensaio, aos quais foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio N, com agitação leve. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha indica a presença de antraquinonas; o desenvolvimento de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e se houver desenvolvimento de coloração azul está indicada a presença de benzoquinonas.

5.3.1.6 Pesquisa de esteróides e/ou triterpenos

Foram reduzidos 30 mL de cada fração em banho-maria a 60 °C a 5 mL; os resíduos foram filtrados. No caso da fração hidroalcoólica remanescente, 30 mL foram levados à secura e ressolubilizados em 5 mL de clorofórmio. Foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1 mL da fração filtrada para tubos de ensaio e o volume foi completado para 2 mL com o solvente. A cada tubo foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado

(reação de Lieberman- Burchard). A produção de coloração rósea escura ou azul indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação em C5 e C6. A coloração verde indica função hidroxila em C3 e dupla ligação em C5-C6; coloração amarela indica metila em C14.

5.3.2 Extrato Aquoso a 20%

O extrato aquoso a 20 % foi preparado por maceração de 40 g de material vegetal seco e estabilizado com 200 mL de água destilada em banho-maria a 60 °C. O extrato foi filtrado em papel de filtro e com ele foram realizadas as análises de características organolépticas, cor e pH.

5.3.2.1 Pesquisa de Heterosídeos Antociânicos

Foram colocadas em três tubos de ensaio porções de 5 mL do extrato aquoso. Ao primeiro foi acidificado com ácido sulfúrico 1N até pH 1; o segundo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10 e o terceiro neutralizado até pH 7. O aparecimento de diferentes colorações indica a presença de heterosídeos antociânicos. A presença de leucoantocianidinas (amarelas) pode ser verificada pela seguinte reação de formação de antocianidinas (vermelhas): transferir para funil de separação 10 mL do extrato aquoso e extrair com 2 vezes de 10 mL de butanol saturado com água. Reunir as frações de butanol em cápsula de porcelana e concentrar a 5 mL. Adicionar cinco gotas de ácido clorídrico concentrado e aquecer à ebulição.

5.3.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponínicos

Os três tubos de ensaio utilizados na análise de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente por cinco minutos e foram deixados em repouso por 30 minutos. Após esse período foram adicionadas gotas de ácido clorídrico a fim de verificar se a espuma formada persistia. A espuma

formada foi medida, em centímetros. Espuma persistente, maior ou igual a um centímetro indica a presença de heterosídeos saponínicos.

5.3.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

a) Reação de Isopurpurato de sódio

Em tubo de ensaio foram colocados 15 mL do extrato aquoso e foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico N sem umedece as paredes do tubo. Uma tira de papel picro-sódico foi suspenso com o auxílio de rolha de cortiça na boca do tubo; a tira não deve tocar o extrato. O tubo de ensaio foi colocado em banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. Coloração vermelha no papel indica presença de heterosídeos cianogenéticos.

b) Reação de Schoembein

Em cápsula de porcelana, colocar 5 mL do extrato aquoso mais quatro gotas de hidróxido de sódio ou de potássio a 10 %, três cristais de sulfato ferroso e uma gota de cloreto férrico. Aquecer até a ebulição e adicionar uma gota de ácido clorídrico concentrado. O desenvolvimento de coloração azul da Prússia indica presença de heterosídeo cianogenético.

5.3.2.4 Pesquisa de taninos

a) Reação com cloreto férrico 1 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionadas cinco gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração verde a azul, cinza, marrom ou formação de precipitado indicam a presença de taninos.

b) Reação com sulfato de ferro amoniacal 1 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionadas duas gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal a 1%. O desenvolvimento de coloração de verde a azul indica a presença de taninos.

c) Reação com acetato de chumbo 10 % (m/v): A 5 mL do extrato aquoso foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e 5 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 %, gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

d) Precipitação com solução de gelatina a 2,5 % em cloreto de sódio a 0,9%: O extrato foi transferido para tubos de ensaio em frações de 0,5 mL, 1 mL e 2 mL. A cada tubo foram adicionados 2 mL da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado nesta fase indica a presença de taninos.

e) Reação com formol-clorídrico: Em balão de fundo chato de 100 mL de capacidade foram colocados 30 mL do extrato aquoso, 6,0 mL de formaldeído e 4,0mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora e o conteúdo foi filtrado a quente. O resíduo do papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 % e foi gotejada solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado foi adicionado excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

5.3.2.5 Pesquisa de Aminogrupos

Em um béquer 10 mL do extrato aquoso foram concentrados a 5 mL em banho-maria a 60 °C. Cinco gotas do extrato concentrado foram depositadas em papel de filtro, em pontos previamente determinados. Depois de secas, o reativo de ninhidrina foi nebulizado sobre o papel de filtro, que foi levado para a estufa à temperatura de 100 °C por 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azulviolácea indica a presença de aminogrupos.

5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

O extrato bruto etanólico (EBEtOH) foi obtido através da extração de 1190g das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* por meio de aparelho de Soxhlet, utilizando etanol 96°GL. O EBEtOH obtido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida. Aproximadamente cinco gramas do EBEtOH obtido foi reservado para a realização dos ensaios biológicos, sendo o restante destinado ao particionamento.

5.5 PARTICIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

A partição líquido-líquido consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis. Foi utilizada para tornar as misturas das substâncias químicas presentes no extrato etanólico bruto de *G. uruguensis*, mais simples, de acordo com a polaridade.

O EBEtOH foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet utilizando solventes em escala de polaridade crescente. Os solventes utilizados para a partição foram: hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório, pesadas e armazenadas em geladeira para posterior estudo, tendo sido nomeadas como fração hexano (FHEX), fração diclorometano (FDCM), fração acetato de etila (FACOEt) e fração hidroalcoólica remanescente (FHR).

5.6 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS

5.6.1 Cromatografia em coluna

A cromatografia em coluna (CC) foi realizada em colunas de vidro, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2mm Merck®).

A fração clorofórmio foi dissolvida em metanol e incorporada a duas partes de sílica-gel para cada parte de amostra, utilizando constante homogeneização em cápsula de porcelana, promovendo a evaporação do

solvente, até a formação da pastilha, sendo submetida à cromatografia líquida em coluna.

A coluna foi empacotada com sílica-gel na proporção de cinco partes em relação à pastilha, sendo que as mesmas foram separadas por um papel de filtro, a fim de minimizar possíveis perturbações na coluna.

Como fase móvel foram utilizados solventes combinados em gradiente de polaridade crescente. Iniciou-se com 100 % de hexano num volume de 100 mL, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de acetato de etila. Após iniciou-se outro gradiente de polaridade, 100 % de acetato de etila, com variação de 5 % em 5 % de metanol. Foram coletadas subfrações de aproximadamente 15 mL em frascos de vidro.

5.6.2 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada em análises fitoquímicas. Neste trabalho foram utilizadas a CCD para fins analíticos qualitativos, e a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) com finalidade de isolamento e purificação das substâncias em misturas presentes na amostra.

Após a evaporação a temperatura ambiente dos solventes, as subfrações obtidas (item 3.6.1) foram analisadas através de CCD utilizando cromatoplasmas de sílica-gel 60 (F254 Merck®).

O sistema eluente utilizado foi hexano/acetato de etila/ ácido fórmico 6:6:0,3. Os reveladores utilizados para a visualização dos compostos foram luz ultravioleta em 254 e 366 nm (método físico) e pulverização com solução de vanilina sulfúrica 1:1 seguido de aquecimento (método químico).

5.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro BRUKER Avance DRX 400 operando na frequência base de

400 MHz e 100 MHz para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente. Antes da análise, aproximadamente 10 mg de cada amostra foi solubilizada em 500 μL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. Foram realizados os experimentos de ^1H e ^{13}C /DEPT.

5.7 Ensaios Biológicos

A fim de realizar um screening de possíveis atividades biológicas foram realizados ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliação da toxicidade, atividade antioxidante, atividade microbiológica e atividade alelopática das cascas do caule da espécie *G. uruguensis*.

As amostras avaliadas nos ensaios biológicos correspondem ao extrato bruto etanólico e frações obtidas a partir do extrato bruto etanólico obtidos e conservados conforme itens 5.4 e 5.5.

5.7.1 Avaliação Toxicológica

Para a avaliação toxicológica das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* foram utilizados dois métodos: letalidade para náuplios de *Artemia salina* e atividade hemolítica.

5.7.1.1 Letalidade para Náuplios de *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em lagos de água salgada e salinas, sendo muito utilizado na alimentação de peixes e outros crustáceos.

Seus ovos não eclodidos são metabolicamente inativos, podendo ser conservados por longos períodos quando desidratados (IPIMAR) Ao serem reidratados os ovos eclodem em cerca de 24 horas, chegando a fase adulta em aproximadamente 25 dias

O ensaio de toxicidade utilizando *Artemia salina* é rápido, tem baixo custo, boa eficiência e requer pequena quantidade de amostra (2-20mg). Além disso, não requer métodos assépticos, nem equipamentos especiais, sendo portanto, muito utilizado com a finalidade de triagem em laboratórios de fitoquímica.

Para este ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Meyer *et al.*, (1982) com algumas modificações.

Cistos de *A. salina* (0,5g/ml) foram adicionados a uma solução salina (35,775g/L) previamente preparada utilizando água deionizada e sal marinho. Durante as 48 horas necessárias para a formação dos náupilos, mantiveram-se constantes iluminação artificial, aeração leve e $\text{pH} \cong 9$.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 50mg do extrato ou fração em 5ml de metanol, obtendo-se uma solução estoque denominada solução A. Da solução A tomou-se 1ml e adicionou-se 9 ml de metanol, obtendo-se a solução B. Da solução A volumes de 250 e 25 μl e da solução B 25 μl foram pipetados, em triplicata, e adicionados a frascos de penicilina. As amostras obtidas foram levadas a estufa a 36°C até a completa evaporação do solvente. O volume de cada concentração avaliada foi ajustado para 2,5 ml com solução salina, originando respectivamente as concentrações de 1000 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ e 10 $\mu\text{g/ml}$.

Após a eclosão, 30 ovos de *A. salina* foram testados durante 24 horas frente a cada amostra. Todas as etapas foram acompanhadas, utilizando-se sulfato de quinidina como controle positivo e metanol como controle negativo. Os dados foram analisados através do método de Probit (Finney, 1962) e expressos como DL_{50} , sendo as amostras consideradas ativas quando a DL_{50} se apresentou menor que 1000 ppm.

5.7.1.2 Avaliação da Atividade Hemolítica

Para esse ensaio primeiramente foi utilizada a metodologia de FLACH, KARNOPP, CORÇÃO (2005). Em discos de papel whatman número 1, foram aplicados em duplicata 20 μL da amostra a ser testada na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após este procedimento o disco de papel whatman número 1, foi

levado à secura, em estufa a 50°C, sendo então aplicado sobre placa de ágar sangue. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 35°C e após este processo foi medido o halo formado no Ágar sangue e comparado aos controles. Como controle negativo foi utilizado 20 µL de solvente metanol. Como controle positivo foi utilizado uma solução 2%p/v de saponina.

A avaliação hemolítica foi também realizada conforme a metodologia descrita pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998). Para o preparo da solução, 1 mL de sangue de carneiro foi transferido para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4. (Suspensão diluída 2%).

Para a realização do teste foi necessário preparar a diluição em série com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue a 2%. Foram usados 4 tubos de ensaio, partindo da concentração de 1000 µg/mL, conforme o QUADRO 1.

QUADRO 1 - SOLUÇÕES PARA TESTE PRELIMINAR

TUBOS DE ENSAIO	1º	2º	3º	4º
Amostra (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

Após o preparo da solução os tubos foram agitados cuidadosamente os evitando a formação de espuma. Transcorridos 30 minutos, os tubos foram novamente agitados e deixados em repouso por 150 minutos. Por fim, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2500 rpm. Após este processo foi preciso examinar os tubos de ensaio e anotar em qual dos tubos ocorreu hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

5.7.2 Avaliação da Atividade Antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* foram utilizados três métodos: redução do complexo fosfomolibdênio, sequestro de radicais *2,2-difenil-1-picrilhidrazila* e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

5.7.2.1 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

A atividade antioxidante total foi determinada através do método da redução do complexo fosfomolibdênio descrito por PRIETO, PINEDA e AGUILAR (1999).

A atividade antioxidante de cada amostra foi comparada a atividade dos padrões ácido ascórbico e rutina, compostos com atividade antioxidante reconhecida.

As amostras utilizadas nessa avaliação correspondem ao extrato bruto etanólico e as frações obtidas a partir do extrato bruto etanólico. Para cada amostra analisada, inclusive para os padrões de referência, foi preparada uma solução metanólica na concentração de 200 µg/mL.

Destas, alíquotas de 0,3mL foram adicionados a 3 mL de solução reagente do reativo fosfomolibdico (molibdato de amônio 4 mM, fosfato sódico monobásico 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por 90 min e, após resfriamento, a obtenção, em triplicata, das absorbâncias, foi realizada em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 695nm. Como branco foi utilizado 0,3mL de metanol com 3 mL do reagente. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado metanol.

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante reativa (AAR) em relação aos padrões, conforme as equações:

$$AAR\% \text{ em relação ao controle} = \left(\frac{Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}}{Abs \text{ controle} - Abs \text{ branco}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

Abs amostra: absorbância da amostra

Abs branco: absorbância do branco

Abs controle: absorbância do controle

5.7.2.2 Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

O potencial de redução de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) foi determinado segundo metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001).

Foram preparadas soluções metanólicas das amostras e dos padrões (rutina e ácido ascórbico) em diferentes concentrações, das quais alíquotas de 2,5mL foram adicionadas a 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi utilizado um branco contendo 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Como controle negativo foi utilizado 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. O ensaio foi realizado a temperatura ambiente e após 30 minutos, tempo suficiente para reação total entre a amostra e o DPPH, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm.

A atividade removedora de radical foi obtida pela porcentagem de atividade antioxidante (AA), conforme equação 2.

$$\% AA = \left\{ \frac{(Abs amostra - Abs branco)}{Abs controle} \right\} \times 100 \quad (Eq. 2)$$

onde:

Abs amostra: absorbância da amostra

Abs branco: absorbância do branco

Abs controle: absorbância do controle

A fim de comparar os resultados obtidos foi estabelecida a IC₅₀, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH, calculados por regressão linear e plotados em gráficos onde a abscissa representava a concentração da amostra analisada e a ordenada à proporção da porcentagem antioxidante. No intervalo linear foi

estabelecida a equação de reta de primeiro grau ($y=ax+b$) sendo, portanto determinada para cada amostra analisada os valores de IC_{50} .

5.7.2.3 Método de Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

A determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizado de acordo com metodologia descrita por MORAIS *et al.*, (2006), com adaptações.

Foram utilizadas concentrações de 1000 ppm (partes por milhão) e BHT (butil hidróxi tolueno) como padrão. Todo o procedimento foi realizado em quaduplicata.

Para o preparo da fonte de lipídeos foi utilizada gema de ovo previamente separada da clara e filtrada a 5% e solubilizada em solução de SDS.

Em tubos de ensaio foram adicionados 100 μ L da amostra, 400 μ L de água destilada, 500 μ L da solução da gema (5%), 50 μ L da solução de ABAP (0,035%), 1500 μ L de ácido acético a 20% e 1500 μ L da solução de TBA (0,4%). O material assim preparado foi submetido ao banho-maria (95° C) por 1 hora. Após resfriamento, foram adicionados a cada tubo 1500 μ L de n-butanol, sendo os tubos agitados levemente por 10 vezes. Depois dos tubos serem deixados em repouso por 10 minutos, foram centrifugados durante 3 minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes mensurados em espectrofotômetro em 532 nm.

O mesmo processo foi realizado com tubos controle, nos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras, que foi substituída por 100 μ L de metanol. O branco da amostra foi preparado substituindo o ABAP por 50 μ L de água.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem (EQUAÇÃO 3):

$$IA (\%) = 1 - \left(\frac{Abs amostra - Abs branco}{Abs controle} \right) \times 100 \quad (Eq. 3)$$

onde:

IA: índice antioxidante

Abs amostra: absorbância da amostra

Abs branco: absorbância do branco da amostra

Abs controle: absorbância do controle

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), avaliando-se as diferenças entre as concentrações e entre as amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5.7.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O extrato bruto etanólico e frações foram avaliados em uma triagem inicial contra micro-organismos através do método de difusão em disco e posteriormente foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizados com algumas modificações os métodos de Difusão em Disco (BAUER-KIRBY, 1966); e Microdiluição em Placa (CLSI, 2005).

5.7.3.1 Micro-organismos

As culturas de micro-organismos utilizados foram: duas bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), duas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e um fungo leveduriforme: *Candida albicans* (ATCC 10231).

5.7.3.2 Método da Difusão em Disco

A avaliação da atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar utilizando discos de filtro de papel impregnados com as amostras foi realizada conforme metodologia descrita por BAUER-KIRBY (1966) e CLSI (2005), com adaptações.

Com o auxílio de uma alça de repique, 3 a 5 colônias isoladas do micro-organismo teste foram transferidas para um tubo contendo 1,8 mL de solução salina a 0,45%. Após homogeneização a suspensão do micro-organismo teste foi ajustada para 0,1 mL de $1,5 \times 10^8$ células/mL, compatível com a escala 0,5 de McFarland. Com o auxílio da alça de Drygalski, 100 μ L do inóculo microbiano foram espalhados sobre a superfície de ágar Müeller Hinton em placa de Petri. As amostras foram resuspendidas em metanol na concentração de 100 mg.mL⁻¹. Os discos de filtro de papel foram impregnados com 10 μ L do extrato bruto das amostras das espécies e deixados secar a temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pinça estéril foram colocados sobre as placas inoculadas com os micro-organismos teste dois discos de cada amostra. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 28°C por 48 horas, quando leveduras e 24 horas quando bactérias. Todo procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar com material esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. As amostras padrões dos controles positivos, fungicida Cetoconazol e do bactericida Cloranfenicol, foram utilizadas para comparação de resultados entre os ensaios, nas concentrações de 50 μ g/disco e 30 μ g/disco, respectivamente.

5.7.3.3 Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano. A determinação da CIM foi realizada utilizando-se a metodologia, com modificações, descrita na CLSI (2005).

Foram preparadas soluções-mãe na concentração de 1 mg/ mL a partir de todas as amostras, empregando metanol como solvente.

Para o teste com bactérias foi utilizando o caldo de Mueller-Hinton e para o ensaio com o fungo foi utilizado o meio Sabouraud Dextrose. Foram processadas diluições seriadas, para resultar em concentrações entre 1000 e 7,8 μ g/mL das amostras em estudo, distribuídos em 100 μ L em cada orifício da microplaca estéril com 96 poços. Em seguida, foram adicionados 5 μ L dos inóculos contendo 5×10^5 UFC/mL e as placas foram incubadas em estufa

bacteriológica a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas quando bactérias e por 48 horas quando levedura.

Após o período de incubação adicionaram-se 10 μL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (5% v/v) em água, à cada cavidade das microplacas utilizadas, que foram novamente levadas a temperatura de incubação durante 30 min para verificar o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata, utilizando Cloranfenicol, a 30 $\mu\text{g/mL}$ e Cetoconazol a 50 $\mu\text{g/mL}$ como padrão.

5.7.4 Avaliação da Atividade Alelopática

A metodologia seguiu o proposto por DIAS *et al.* (2005) utilizando sementes de *Lactuca sativa* cv Baba de verão. As amostras utilizadas foram diluídas em soluções de concentrações decrescentes (0,8 - 0,4 - 0,2 - e 0,1 mg) em 2 mL de metanol, em duplicata. Com intuito de obter dissolução completa da amostra a ser analisada, escolheu-se metanol como solvente.

Papel de filtro (Whatman nº 6) recortado do tamanho das caixas de poliestireno (caixas de poliestireno cristal, quadradas com 11 cm e 3,5 cm de altura, contendo tampas), conhecidas como Gerbox[®] foi embebido com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocado em estufa a 60°C por 24 horas para total evaporação do solvente. Trabalhando-se em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro com as amostras, previamente secos foram colocados nas caixas Gerbox[®] e umedecidos com água destilada.

A água destilada foi utilizada em quantidade segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA E FRANÇA NETO (1999), ou seja, de duas a três vezes o peso do papel. Após o preparo das caixas 05 sementes de *L. sativa* foram colocadas em cada caixa em quatro repetições, no total de 20 sementes por caixa. As caixas foram protegidas da luz com papel alumínio e colocadas em germinador com temperatura controlada de 20°C . Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento.

Como controle foi preparado caixas somente com água destilada sob as mesmas condições do ensaio. Utilizou-se também metanol como controle para posterior verificação da influência ou não do solvente empregado na diluição das amostras utilizadas.

Para o estudo da germinação foi realizado leituras diárias no mesmo horário, abrindo as caixas em fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas diariamente até o sétimo dia. As sementes foram consideradas germinadas conforme descrito por DE FEO, DE SIMONE E SENATORE (2002) e ADEGAS, VOLL E PRETE (2003), ou seja, quando se tornar visível a protrusão da radícula através do tegumento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada repetição de cada tratamento (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; FRANÇA NETO, 1999). O IVG foi calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-a pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas a análise estatística.

A leitura do crescimento foi realizada apenas ao último dia de ensaio com abertura das caixas e retirada das plântulas uma a uma (com auxílio de uma pinça) medindo em papel milimetrado o comprimento da radícula e do hipocótilo. Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos a análise estatística.

A diferença estatística entre os tratamentos foi determinada por meio do teste de Scott-Knott para múltiplas comparações e fixou-se $p < 0,05$ para indicar significância estatística. As médias obtidas pelo teste de Scott-Knott foram comparadas em porcentual em relação ao controle (SILVA, 2009) O tratamento foi considerado efetivo quando todas as repetições estiveram no mesmo grupo de médias.

5.8 FLUXOGRAMA DA PESQUISA

As principais etapas do desenvolvimento da pesquisa estão ilustradas na FIGURA 7.

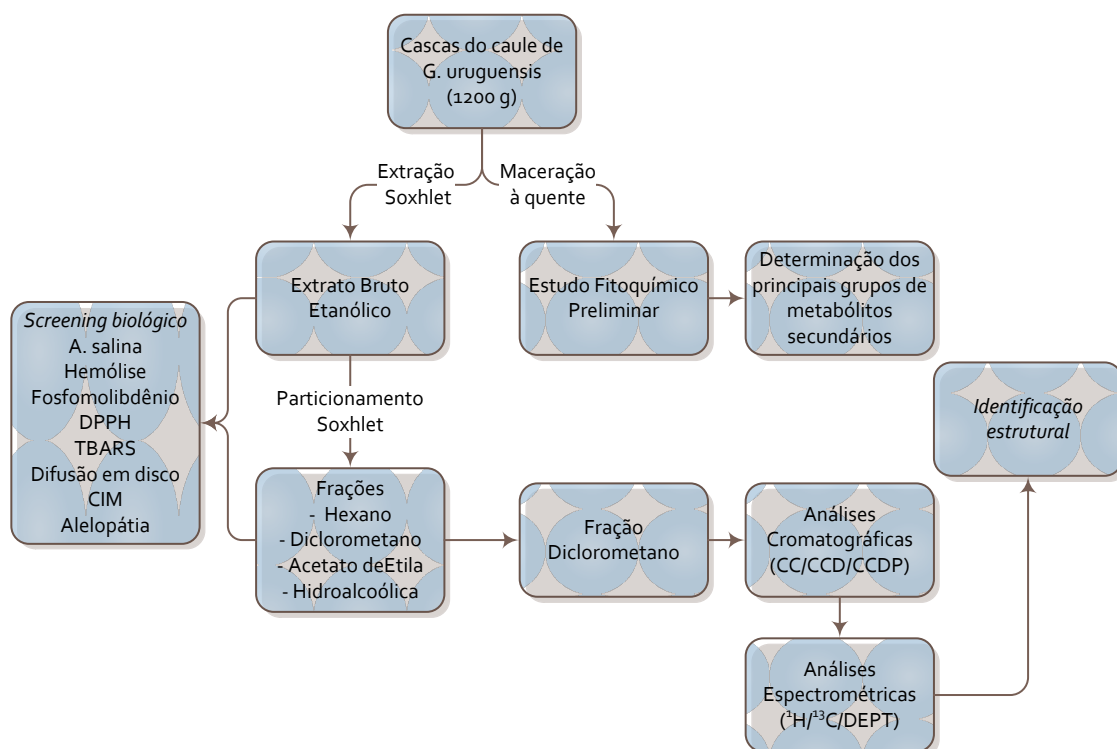


FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

6 RESULTADOS

6.1 DETERMINAÇÕES FÍSICAS

As determinações de umidade, cinzas e densidade foram realizadas em triplicata e os resultados estão expressos pela média obtida (TABELA 3).

TABELA 3 - DETERMINAÇÃO DE UMIDADE E CINZAS

DENSIDADE (g/ml)	PERDA POR DESSECAÇÃO (%)	CINZAS TOTAIS (%)
0,3762	7,0566	2,0633

O teor de umidade residual foi estabelecido pela perda por dessecação, que indicou um valor abaixo (7,0566%), porém próximo (8-14%). dos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira. Por apresentar valores razoavelmente dentro do limite máximo aceitável, pode-se garantir a estabilidade química e biológica do material vegetal, uma vez que um alto teor de umidade propicia o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com consequente deterioração dos constituintes químicos.

O resultado da determinação de cinzas totais (2,0633%) apresentou-se bem abaixo de 14%, conforme os limites estabelecidos para diversas drogas vegetais descritas na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2000), indicando dessa forma que as mesmas não possuem excesso de substâncias aderentes de origem terrosa que poderiam estar presentes como contaminantes.

Os resultados obtidos nesses ensaios contribuem no processo de padronização de parâmetros de qualidade para as cascas do caule da espécie *G. uruguensis* devido à ausência de limites estabelecidos na literatura para essa espécie.

6.2 ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISES EM FITOQUÍMICA

O ensaio fitoquímico preliminar indica através de reações características os principais grupos de metabólitos secundários presentes na amostra.

O resultado da prospecção fitoquímica realizada com as frações do extrato hidroalcoólico a 20% e com o extrato aquoso a 20% está indicado pela TABELA 4 e TABELA 5.

TABELA 4 - RESULTADO DO ENSAIO SISTEMÁTICO PARA ANÁLISES EM FITOQUÍMICA REALIZADO PARA AS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO A 20%.

METABÓLITOS/ENSAIOS	RESULTADOS/FRAÇÕES			
	HEX	CHCl ₂	AcOEt	HR
Alcalóides				
Reativo de Mayer	+	+	-	-
Reativo de Dragendorff	-	-	-	-
Reativo de Burchardat	-	-	-	-
Reativo de Bertrand	+	+	-	-
Flavonóides	-	-	-	-
Leucoantocianidinas				
Cumarinas	-	+	-	+
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteróides/Triterpenos				
Liebermann-Burchard	+	+	+	+

HEX: FRAÇÃO HEXANO; CHCl₂: FRAÇÃO DICLOROMETANO; ACETO: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; HR: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE. +: POSITIVO; -: NEGATIVO.

Os grupos de metabólitos secundários encontrados nas frações do extrato hidroalcoólico a 20 % foram: alcaloides, cumarinas, esteroides e/ou triterpenos.

Para as frações diclorometano e hidroalcoólica de cascas do caule, a observação de fluorescência azul e verde amarelada na câmara de ultravioleta a 366 nm, indicou a presença de cumarinas.

A pesquisa de esteroides/triterpenos nas cascas dos caules foi positiva para as frações hexano e diclorometano. A reação de Liebermann-Burchard é um indicativo positivo quando há desenvolvimento de colorações como o amarelo, azul, verde ou rosa (SIMÕES *et al.*, 2007).

TABELA 5 - Resultado do ensaio sistemático para análises em fitoquímica realizado para o extrato aquoso a 20%.

METABÓLITOS/ENSAIOS	RESULTADOS
Heterosídeos antociânicos	-
Heterosídeos saponínicos	+
Heterosídeos cianogenéticos	-
Taninos	
Cloreto férrico 1%	+
Gelatina 2,5%	-
Formol-clorídrico	+
Aminogrupos	+

+: Positivo; -: Negativo.

Para o extrato aquoso os grupos encontrados foram: heterosídeos saponínicos, taninos e aminogrupos.

A pesquisa de heterosídeos saponínicos nos extratos aquosos indica resultado positivo, sendo que todos os tubos apresentaram espuma persistente e com altura superior a 1 cm. A oxidação de taninos por cloreto férrico produzindo coloração marrom nas cascas do caule indicou a presença de polifenóis, enquanto que a coloração verde desenvolvida na reação dos extratos com formol clorídrico indicou a presença de taninos condensados.

6.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE *G. uruguensis*.

O EBEtOH foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet através de escala de polaridade crescente, utilizando hexano, diclorometano e acetato de etila, originando as frações hexano (FHEX), diclorometano (FDCM), acetato de etila (FAcOEt) e fração hidroalcoólica remanescente (FHR) (FIGURA 8).

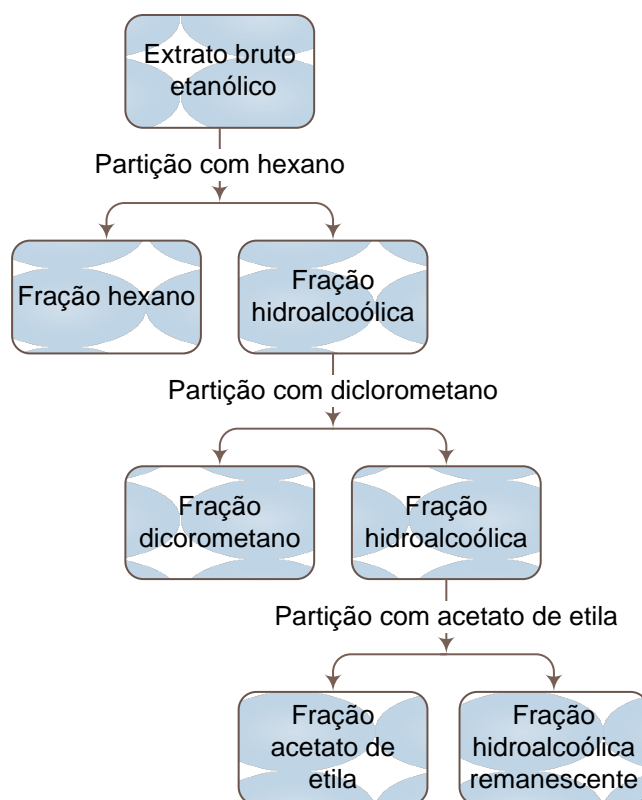


FIGURA 7 - PARTICIONAMENTO DO EBETOH

As frações obtidas foram levadas a secar em banho-maria a aproximadamente 45°C, pesadas e armazenadas em geladeira, em recipientes tarados e hermeticamente fechados.

Para as frações obtidas foi calculado o rendimento com base no peso do material vegetal seco utilizado no processo de extração, conforme TABELA 6.

TABELA 6 - Rendimento das frações obtidas através do particionamento do EBETOH.

FRAÇÃO	MASSA DA FRAÇÃO (g)	RENDIMENTO (%)
Hexano	7,3054	0,6
Diclorometano	15,6941	1,3188
Acetato de Etila	9,4647	0,7953
Hidroalcoólica	25,9661	2,182
TOTAL	58,4303	4,8951

A fração que obteve o melhor rendimento no processo de partição foi hidroalcoólica remanescente (2,182%) seguida da fração diclorometano (1,3188%).

O resultado obtido indica que a maioria dos metabólitos presentes nas cascas do caule da espécie *G. uruguensis* possui natureza hidrofílica, uma vez que grande parte dos metabólitos não foi solúvel nos solventes utilizados no processo de particionamento, gerando a fração hidroalcoólica remanescente.

Alcaloides, triterpenos e saponinas triterpênicas são aos metabólitos majoritariamente descritos para espécies do gênero *Guettarda*. O resultado do ensaio sistemático de análises em fitoquímica realizado para as cascas do caule da espécie *G. uruguensis* (item 4.2) indicou por meio de reações características a forte presença de heterosídeos saponínicos, esteroides e/ou triterpenos e alcaloides, portanto, estão de acordo o perfil químico apresentado pelo gênero e os rendimentos apresentados pelas frações analisadas, uma vez que os metabólitos majoritariamente encontrados no gênero se distribuíram de maneira seletiva, de acordo com o coeficiente de partição, pelos solventes utilizados apresentando maior rendimento aquelas frações onde se encontram os metabólitos descritos.

6.4 ESTUDO DA FRAÇÃO DICLORMOETANO

Parte da fração DCM (10 g) foi submetida a cromatografia em camada delgada, conforme metodologia descrita no item 3.6.1, resultando em 60 subfrações de aproximadamente 15 mL cada. Após a evaporação a temperatura ambiente dos solventes, todas as subfrações foram analisadas por cromatografia em camada delgada, conforme descrito no item 3.6.2 sendo reagrupadas as subfrações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse procedimento resultaram dois grupos: DCM_1A e DCM_1B.

O grupo DCM_1A (17-26; 17 mg) demonstrou somente uma mancha na placa de CCD, sugerindo pureza sendo portanto, encaminhada para as análises espectroscópicas.

O grupo DCM_1B (34-44) não demonstrou pureza significativa quando avaliada por CCD, optando-se pela realização de uma nova coluna

cromatográfica, resultando nos grupos DCM_2A e DCM_2B. O grupo DCM_2A (46-53; 62,8 mg), demonstrou em CCD a presença de três manchas bem distintas em todas as subfrações reunidas, optando-se pela realização de uma CCDP, obtendo-se a amostra DCM_2A1 (28,7379 mg). Ainda com relação ao grupo DCM_1B, obtivemos a amostra DCM_2B (58-60; 13,2123), por terem apresentado em CCD somente uma única mancha, sugerindo pureza sendo, portanto encaminhada para as análises espectroscópicas.

Neste trabalho foi sugerida uma estrutura para DCM_1A, uma vez que ao se comparar os dados espectroscópicos de ^1H , ^{13}C /DEPT dos grupos DCM_2A1 e DCM_2B com dados da literatura através de pesquisa no Banco de Dados Scifinder não foi possível correlacionar, sugerindo tratar-se de substâncias inéditas, necessitando, portanto de estudos adicionais. A FIGURA 9 resume o processo adotado no estudo fitoquímico da fração DCM das cascas do caule da espécie *G. uruguensis*.

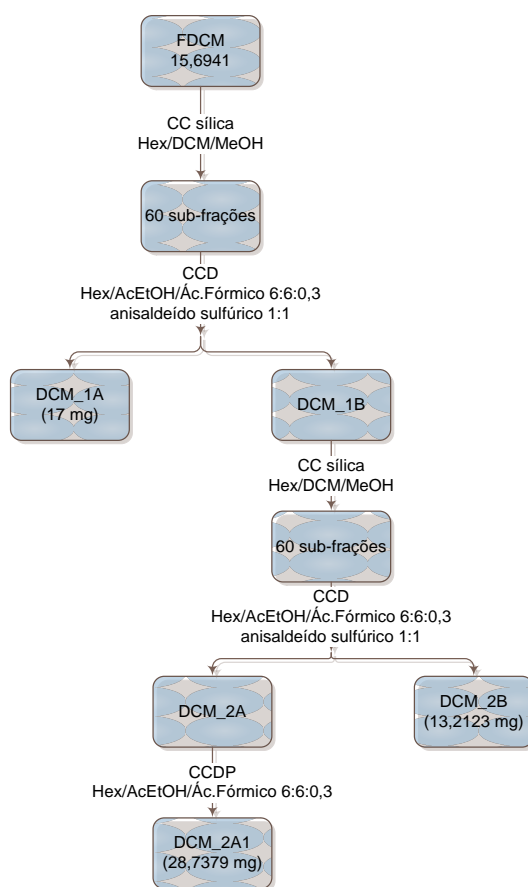


FIGURA 8 - ETAPAS DO ESTUDO FITOQUÍMICO DA FRAÇÃO DCM DAS CASCAS DO CAULE DA ESPÉCIE *G. uruguensis*

6.4.1 DCM_1A

Os dados espectroscópicos de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ levaram a sugerir que a amostra DCM_1A seja composta por uma mistura de um triterpeno pentacíclico e uma saponina triterpênica tendo como aglicona o esqueleto urs-12-eno.

O espectro de RMN de ^1H (FIGURA 11) apresentou sinais na região característica de hidrogênios metílicos de triterpenos e na região de hidrogênios oximetínicos e oximetilênicos típico de açúcares. Foram observados sinais de hidrogênios referentes a sete metilas, δ 0,77; 0,85; 0,87; 0,95; 1,07; 1,24 e 1,26 e um hidrogênio olefínico em δ 5,36 (s) no espectro de RMN de ^1H .

O espectro de ^{13}C (associado ao espectro de DEPT (FIGURA 12-15) apresentou sinais de carbonos metilênicos em δ 38,81 (C-1); 27,75 (C-2); 18,5 (C-6); 39,91 (C-7); 23,48 (C-11); 28,38 (C-15); 24,03 (C-16); 30,45 (C-21); 37,62 (C-22); e metílicos em δ 28,38 (C-23); 15,52 (C-24); 16,47 (C-25); 18,03 (C-26); 23,48 (C-27); 181,35 (C-28) e 21,3 (C-30). Foram observadas absorções em δ 76,87 (C-3) referente ao carbono oximetínico, em δ 176,41 (C-28) correspondente a carbonila do ácido e em δ 139,37 e 126,28 (C-12 e C-13) sinais relacionados a carbonos olefínicos.

Além dos sinais já discutidos, o espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais que revelaram a presença de uma saponina. Os deslocamentos químicos observados para a unidade glicosídica: 105,3 (C-1'), 74,0 (C-2), 76,8 (C-3), 70,0 (C-4), 76,6 (C-5), 61,3 (C-6) somado ao deslocamento observado em 88,1 (C-3) indicam que a unidade glicosídica está localizada em C-3.

Essas informações associadas à análise comparativa com dados de literatura (TABELA 7) permitiram sugerir a estrutura de um derivado glicosídico de um triterpeno pentacíclico da série ursano (FIGURA 10).

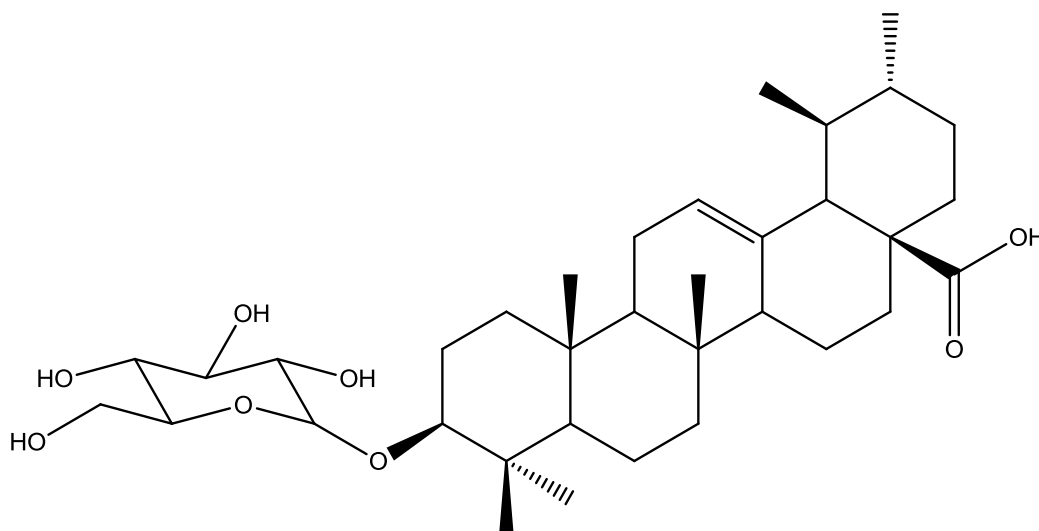


FIGURA 9 - ÁCIDO URSÓLICO GLICOSILADO

Para o Ácido Ursólico (ácido (3 β)-3-hidroxiurs-12-en-28-oico) destacam-se as atividades anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica (Liu, 1995), tripanocida (LEITE *et al.*; 2001). Apresenta baixa ou nenhuma toxicidade, possui aplicabilidade como aditivo em bebidas, alimentos e em cosméticos (LEUNG, FOSTER, 1996) sendo utilizado como emulsificante (LORENZI, MATOS, 2002). Além disso, é um marcador químico de algumas espécies.

Os marcadores químicos são especialmente válidos para autenticar o material vegetal utilizado na produção dos extratos, ponto crucial para garantir a qualidade do produto (BRAGA, 2003).

Apesar de estar presente em várias espécies tropicais (HAYEK *et al.*, 1989), a fonte tradicional de extrações são européias (HAYEK *et al.*, 1989; LEUNG, FOSTER, 1996).

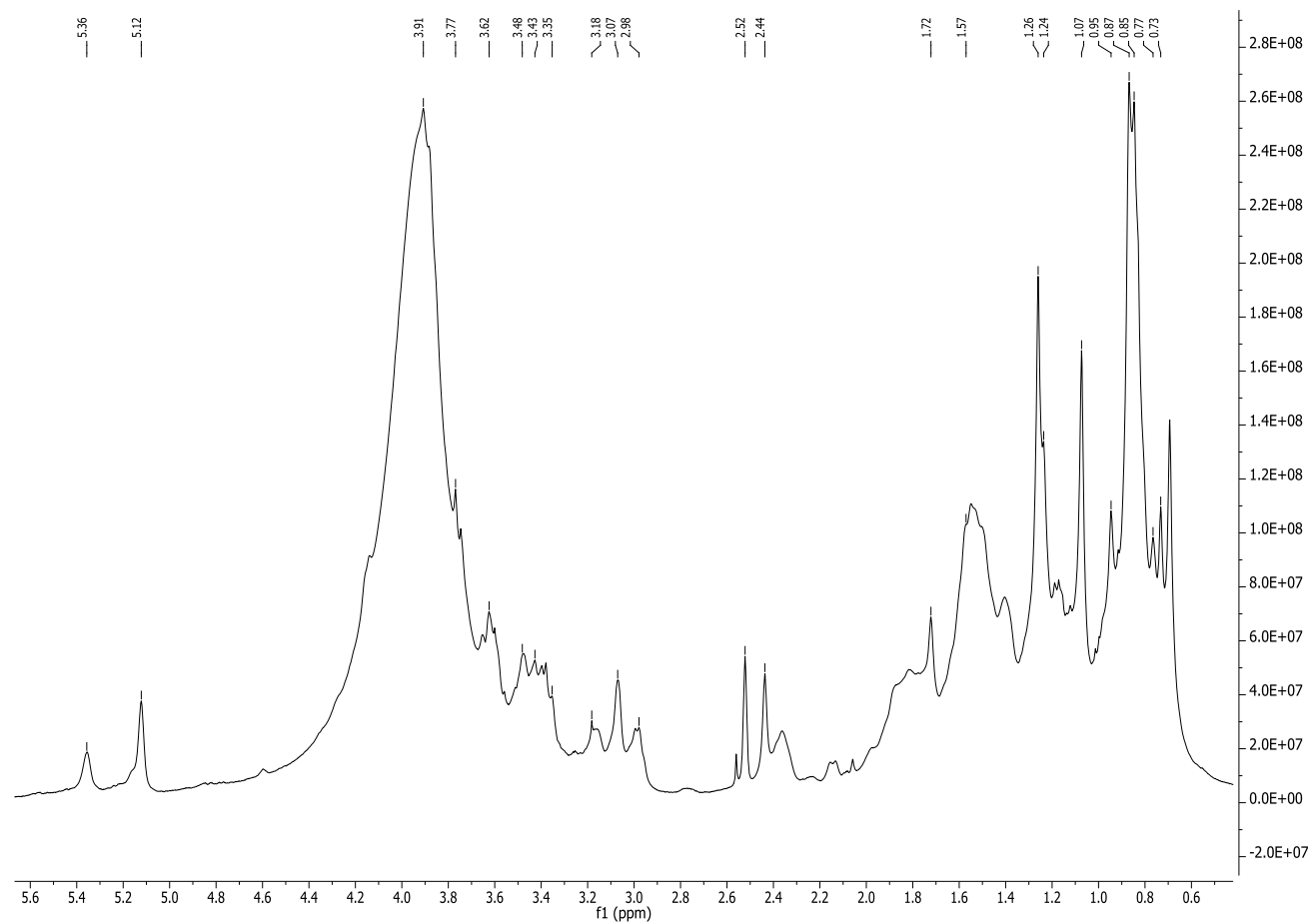


FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6

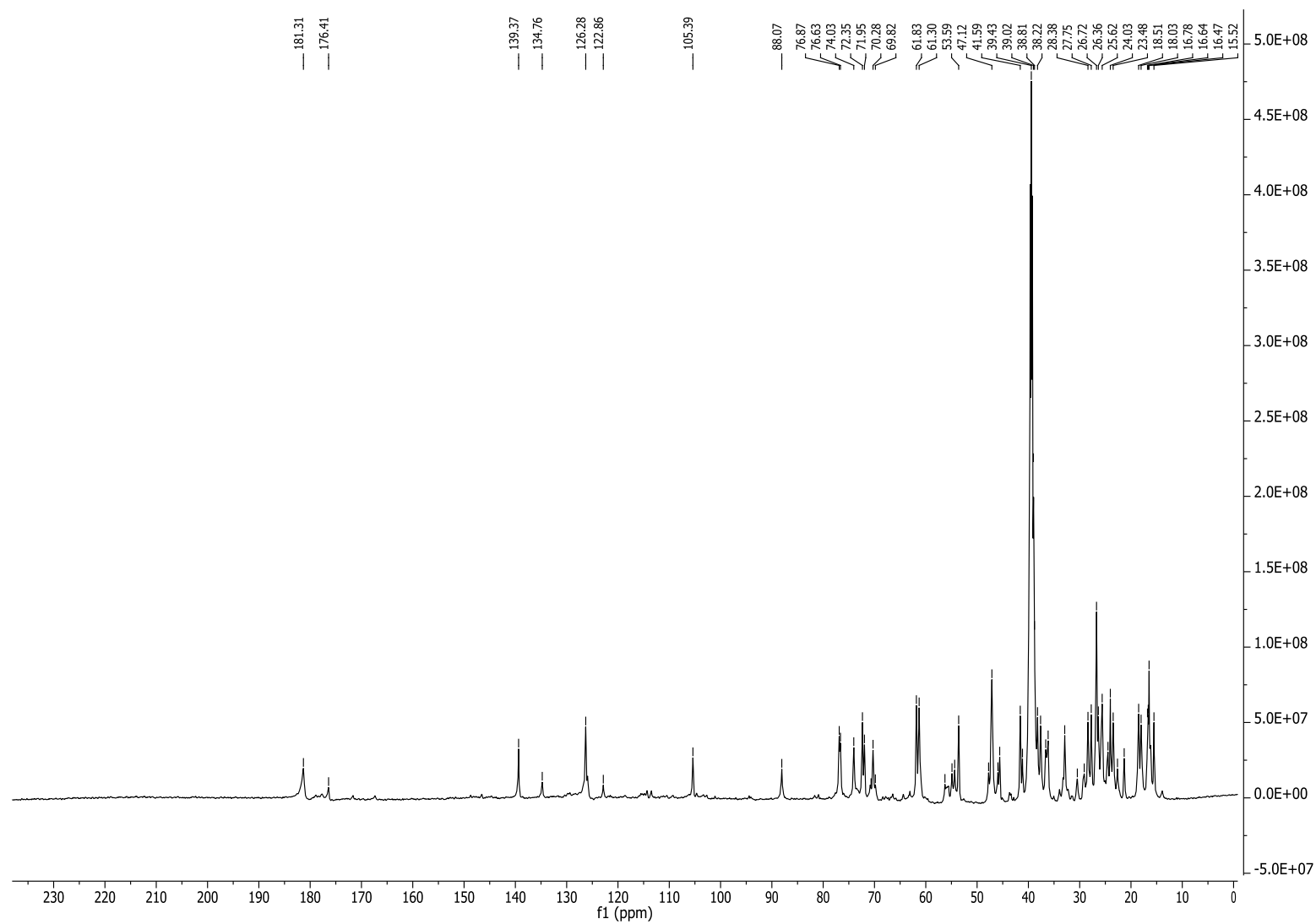


FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6

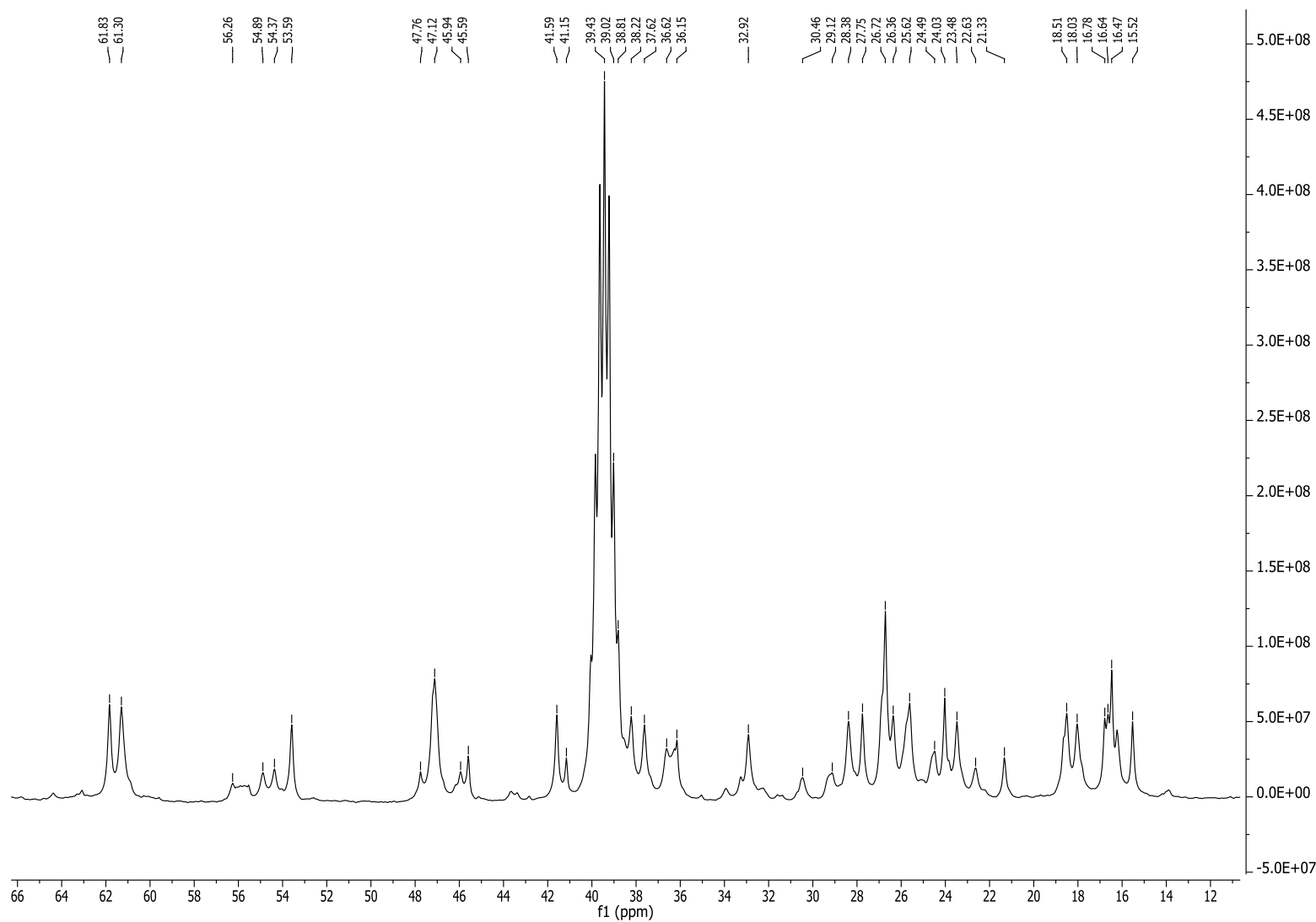


FIGURA 12 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6 NA REGIÃO DE 12 A 66 ppm

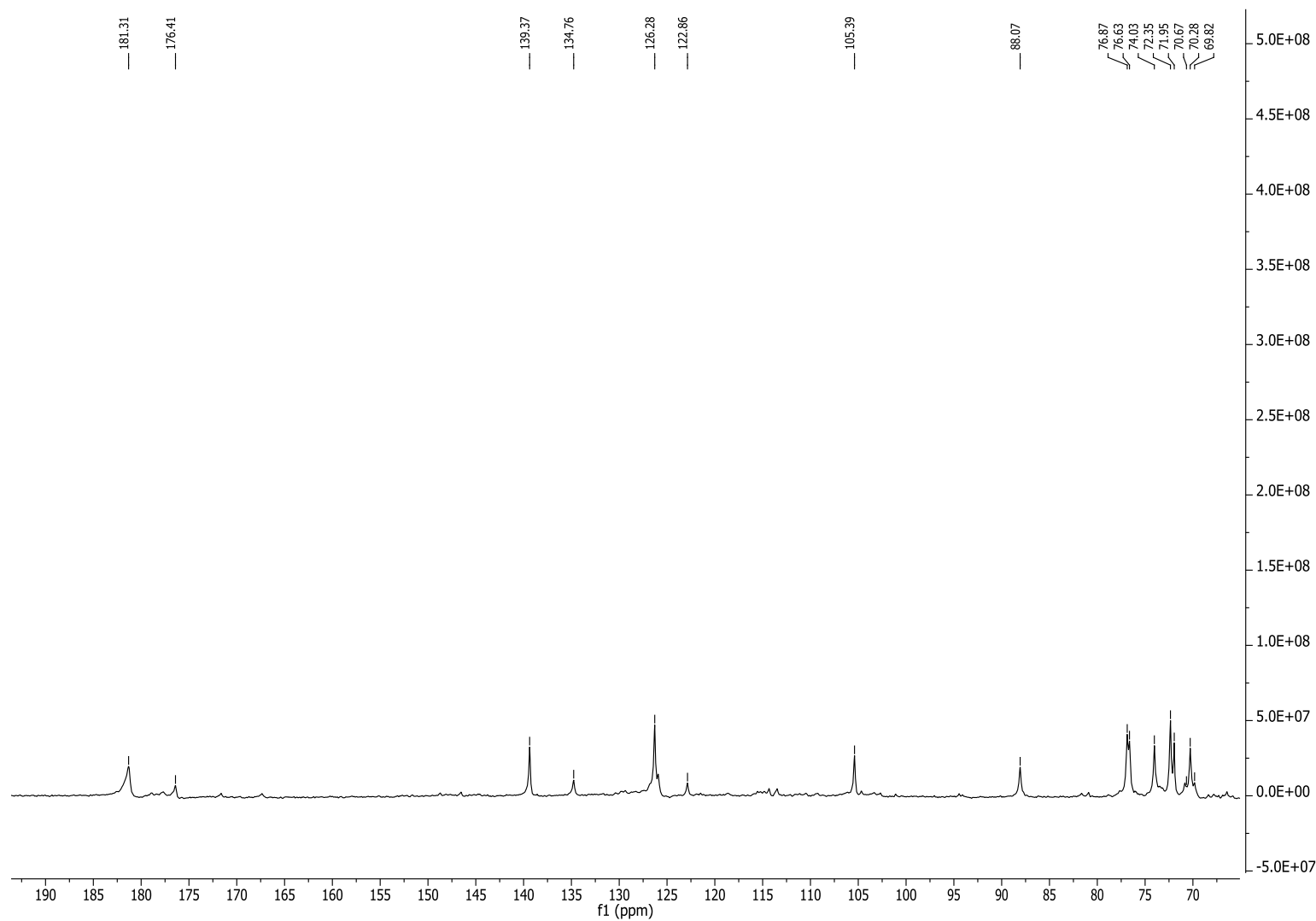


FIGURA 13 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO- D_6 NA REGIÃO DE 70 a 190 ppm

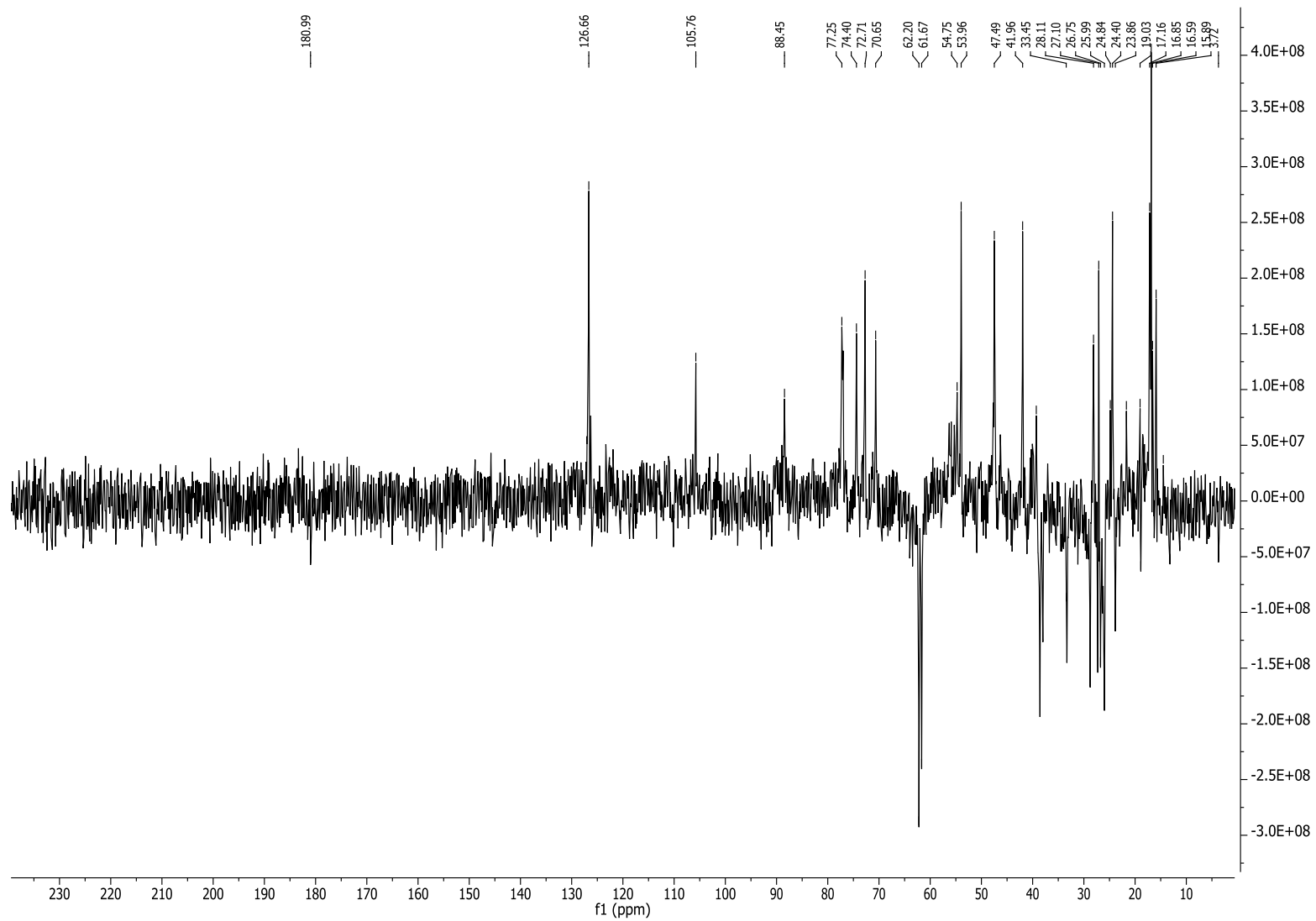


FIGURA 14 - ESPECTRO DE RMN DE DEPT (100 MHz) DA MISTURA DE DCM_1A EM DMSO-D6

TABELA 7 - DADOS DE RMN DE ^{13}C (δ PPM, 100 MHZ, DMSO- d_6) PARA A SUBSTÂNCIA GU 1,A , ÁCIDO URSÓLICO (75,5 MHZ, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; MALHEIROS, 1995) E β -D-GLICOSE (HAMERSKI, 2005; DMSO- d_6 , 500 MHZ)

C	Gu 1A δ_{C}	ÁCIDO URSÓLICO δ_{C}
1	38,81	38,9
2	27,75	27,9
3	88,1	78
4	39,8	39,8
5	54,89	55,7
6	18,5	18,6
7	32,9	33,4
8	39,2	39,2
9	47,12	47,9
10	37,62	37,3
11	23,48	23,4
12	126,28	125,6
13	139,3	139,3
14	41,59	42,3
15	28,38	28,5
16	24,03	24,7
17	47,76	47,9
18	53,59	53,4
19	39,4	39,4
20	39,22	39,2
21	30,45	30,9
22	37,62	37,1
23	28,38	28,6
24	15,52	β -D-glicose 15,5
25	16,47	1' 105,3
26	18,03	2' 74,0
27	24,48	3' 76,8
28	181	4' 70
29	18,03	5' 76,6
30	21,3	6' 61,3

2 DCM_2A1

A análise dos dados de RMN ^{13}C (FIGURA 17-19) permitiu definir o esqueleto triterpênico, tipo ursano, principalmente pela presença dos sinais em δ 127,2 e 138,5 relativos aos carbonos olefínicos C-12 e C-13, respectivamente. Observa-se também sinal em δ 72, correspondente a carbono carbinólico terciário em C-19. Ao se comparar os dados de RMN ^{13}C de DCM_2A1 com os do ácido ursólico proposto

para uma das substâncias de Gu 1 foi possível observar efeito γ (blindagem) em C-21 e C-30, sugerindo a presença de uma hidroxila em C-19.

Foi observado o sinal do carbono aldeídico em δ 207,5. Essa função foi localizada em C-28 e foi observada uma desblindagem nos deslocamentos químicos em C-17 e C-28 em aproximadamente 2,9 e 28,8 ppm, e uma blindagem em C-22 em 4,8 ppm, em comparação ao do ácido ursólico. Pela comparação de dados espectroscópicos (TABELA 8) de DCM_2A1 com dados da literatura propomos para DCM_2A1 a estrutura do 3 β -hidróxiurs-12-en-28-al (aldeído ursólico) (FIGURA 16).

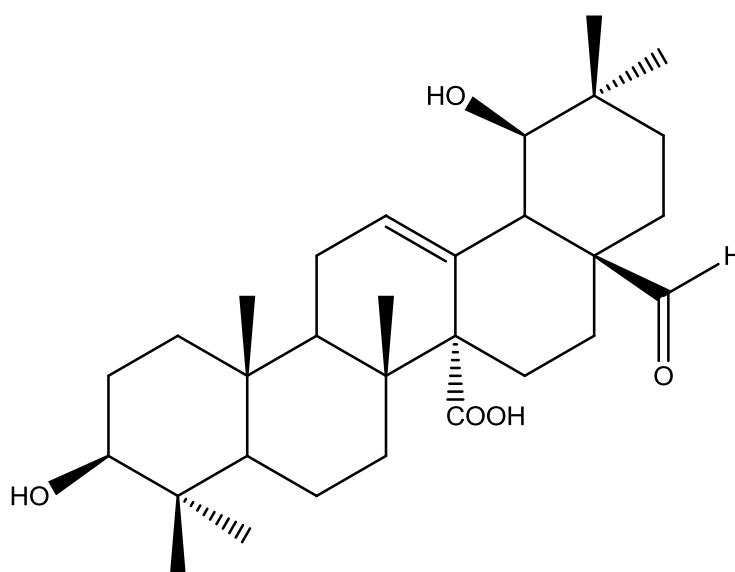


FIGURA 15 - ALDEIDO URSÓLICO

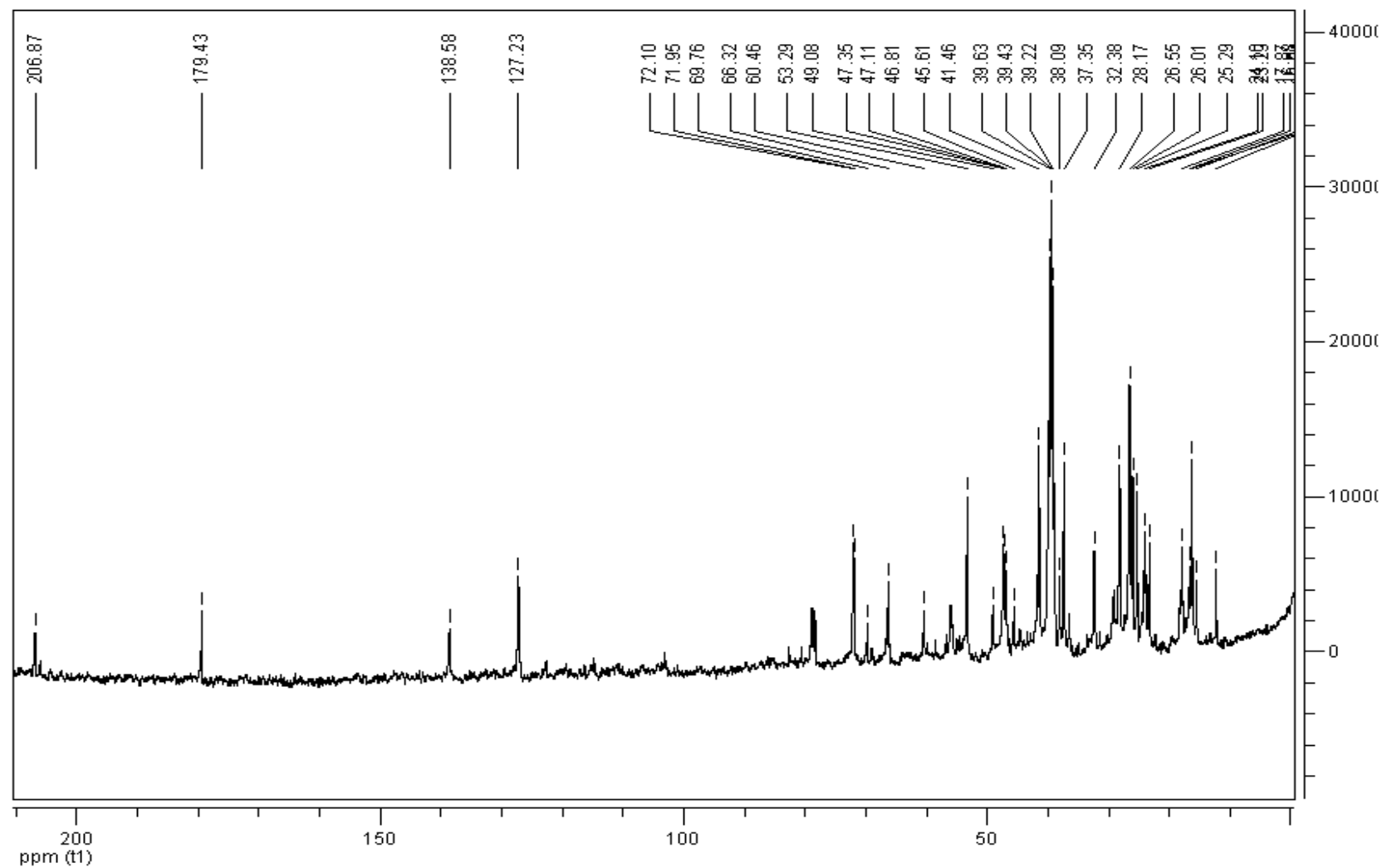


FIGURA 16 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1EM DMSO- d_6

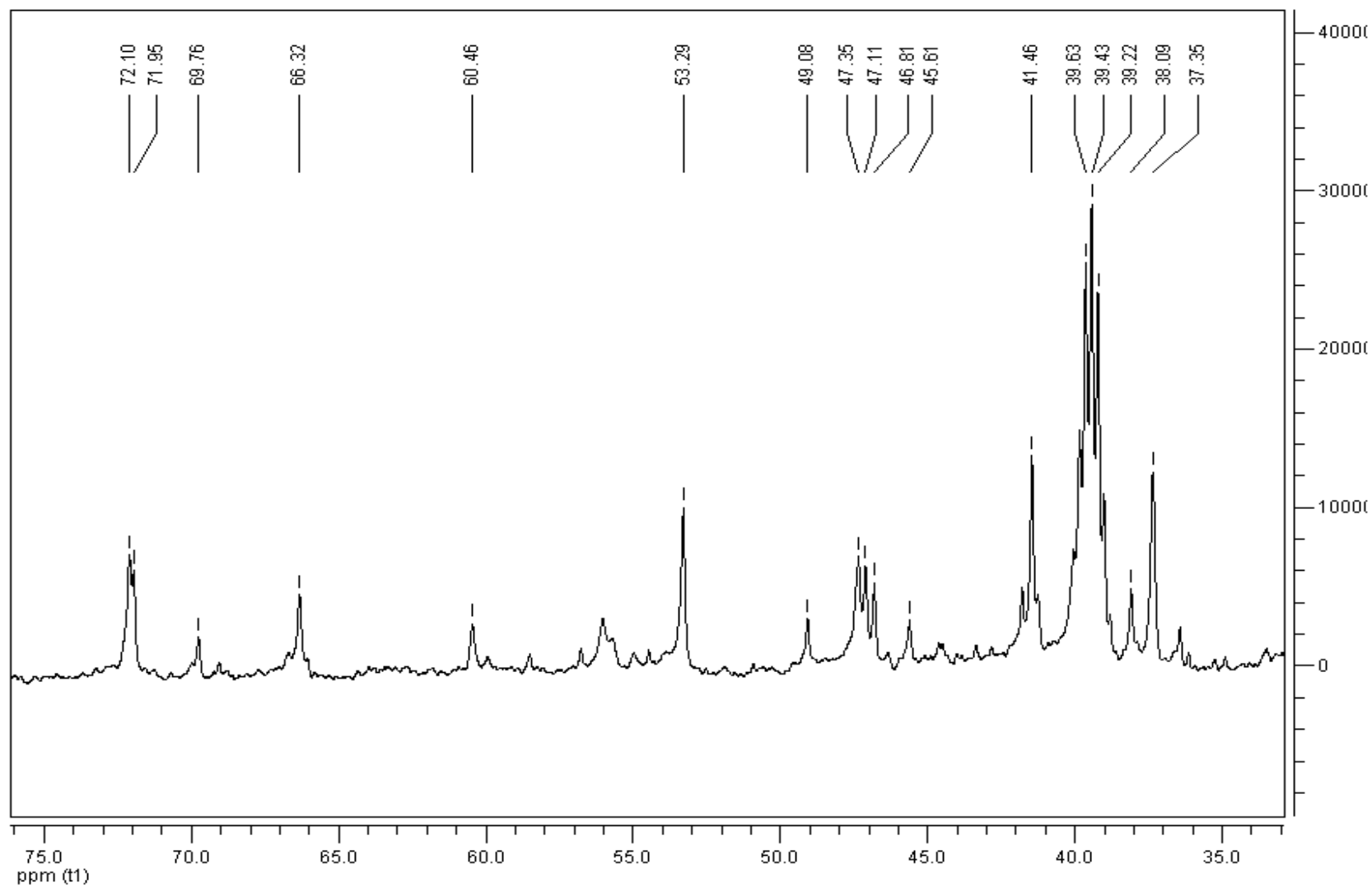


FIGURA 17 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1 EM $\text{DMSO-}d_6$ NA REGIÃO DE 72,10 A 37,35 ppm

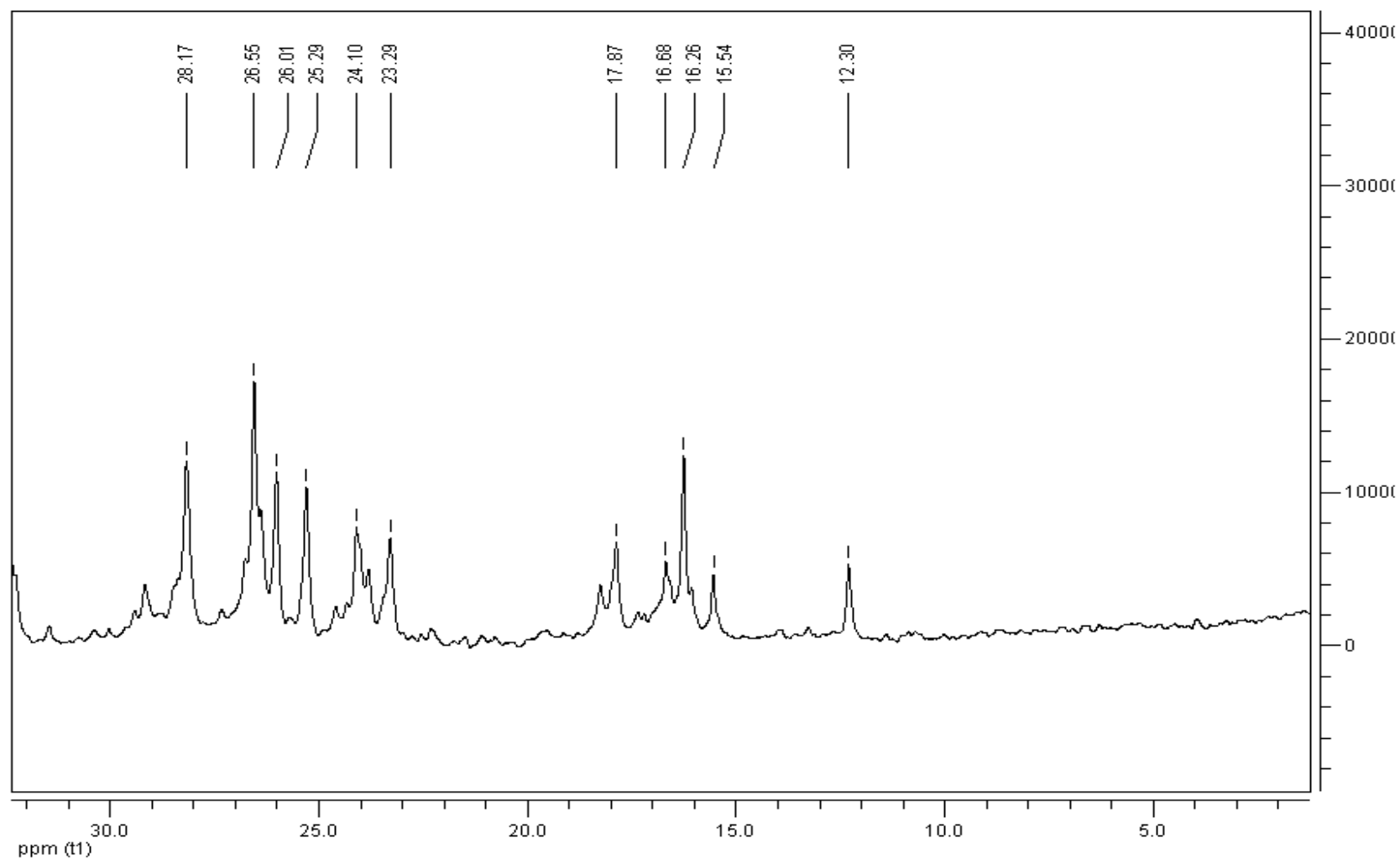


FIGURA 18 - ESPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100 MHz) DE DCM_2A1 EM $\text{DMSO-}d_6$ NA REGIÃO DE 28,17 A 12,30 ppm

TABELA 8 - DADOS DE RMN DE ^{13}C (δ PPM, 100 MHZ, CDCl_3) PARA A SUBSTÂNCIA DCM_2A1, ALDEÍDO URSÓLICO ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO } d_6$; LEMES, 2011) E ÁCIDO URSÓLICO

C	DCM_2A1	ALDEÍDO URSÓLICO δC	ÁCIDO URSÓLICO δC
1	38	38,6	38,9
2	28.1	27,2	27,9
3	78	78,9	78
4	39,78	39,7	39,8
5	53,2	55,1	55,7
6	18.2	18,2	18,6
7	31.4	31,8	33,4
8	41.2	40,3	39,2
9	47.3	47,5	47,9
10	37.3	38	37,3
11	23.2	23,3	23,4
12	127.2	126,2	125,6
13	138.5	138	139,3
14	42.8	42,1	42,3
15	28.1	28,2	28,5
16	23.8	23,4	24,7
17	49	50,5	47,9
18	53.2	52,4	53,4
19	72.0	38,8	39,4
20	38	38,5	39,2
21	24,5	30,1	30,9
22	32.3	33,1	37,1
23	29.1	29,6	28,6
24	16.2	16,1	15,5
25	15.5	15,8	16,4
26	17.8	17,2	17,4
27	179.4	23,1	23,7
28	206.8	207,5	178
29	16,6	16,7	17,3
30	12.3	21,1	21,2

6.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

6.5.1 Teste de letalidade para náuplios de *Artemia salina* Leach

De acordo com Meyer *et al.* (1982), no ensaio de letalidade para náuplios de *Artemia salina* são consideradas ativas as amostras que apresentam DL_{50} inferior a

1000µg/mL, sendo que , resultados inferiores a 100µg/mL representam alta citotoxicidade.

Todas as frações, inclusive o extrato bruto apresentaram algum grau de citotoxicidade. Como podemos observar pela TABELA 9, a fração diclorometano apresentou uma DL₅₀ de 80 µg/mL, um valor equivalente ao valor do controle utilizado, o sulfato de quinidina (DL₅₀= 81,14 µg/mL) podendo ser considerada nesse modelo uma fração com alta citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.

TABELA 9 - RESULTADO DE IC₅₀ PARA REDUÇÃO DO DPPH

AMOSTRA	DL ₅₀ (µg/ml)	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Hexano	537,98	283,61-1020,50
Diclorometano	80,31	31,23-206,51
Acetato	459,56	310,25-680,71
Hidroalcoólica	667,67	352,60-1264,28
Sulfato de Quinidina	81,14	59,54-110,57

Devido ao fato dos resultados obtidos terem demonstrado que o extrato bruto e frações apresentam considerável toxicidade frente ao microcrustáceo, sugerimos que novos ensaios biológicos sejam realizados, uma vez que diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade frente ao microcrustáceo a atividades como antiviral e antiparasitária, entre outras (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Segundo MCLAUGHLIN *et al.*, 1998, o ensaio de toxicidade preliminar utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* exibe boa correlação com atividade citotóxica em tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos *Annonaceous acetogenins* como uma nova classe de agentes antitumorais ativos, observando que os valores de ED₅₀ encontrados para citotoxicidade, correspondiam, em geral, a 1/10 dos valores de IC₅₀ encontrados nos ensaios realizados utilizando *Artemia sp.*, sugerindo portanto que o ensaio de letalidade frente ao microcrustáceo pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

6.5.2 Avaliação Hemolítica

Todas as amostras das cascas do caule da espécie *G. uruguensis* testadas apresentaram resultado negativo, sem presença de halo de hemólise quando avaliadas em placas de ágar sangue nem tampouco apresentaram coloração vermelha, característica da ruptura dos eritrócitos com liberação de hemoglobina.

O resultado de hemólise negativo justifica mais pesquisas para o uso dos extratos, frações ou produtos isolados desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

6.5.4 Método da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio é uma maneira rápida e barata de avaliação da capacidade antioxidante total de matrizes complexas, como é o caso de extratos obtidos a partir de plantas medicinais. Possui ainda a vantagem de possibilitar a avaliação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas.

O fundamento do método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) consiste na redução em meio ácido, do molibdênio VI (Mo^{6+}). À medida que a reação se processa, a coloração amarelada, característica do molibdênio VI (Mo^{6+}) quando em solução, transforma-se em um complexo de cor azul de maneira proporcional a redução do íon molibdato $[\text{MoO}_4]^{2-}$, que é a forma natural do molibdênio quando em solução.

De acordo com Shukor *et al.*, o mecanismo da reação está envolvido na formação de fosfomolibdato como uma espécie intermediária entre molibdato e o complexo de cor azul, sendo favorecido pelas condições do meio (baixo pH da solução e presença de íons fosfato). Nessas condições os íons molibdato combinam-se entre si e formam políons ($[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$, $[\text{Mo}_8\text{O}_{26}]^{4-}$ e $[\text{Mo}_{12}\text{O}_{37}]^{2-}$) que na presença de espécies redutoras formam o complexo azul de isopolimolibdênio, o qual tem sua intensidade medida em espectrofotômetro, sendo atribuída a essa intensidade a atividade antioxidante total as amostras avaliadas.

A atividade antioxidante total das amostras avaliadas pelo método do fosfomolibdênio foi observada por meio da habilidade das mesmas em doar um par de elétrons, mecanismo redox, dependente da presença de substâncias com anéis fenólicos e também através da habilidade das amostras em doar um hidrogênio,

mecanismo radicalar, dependente da presença de substâncias com hidroxilas disponíveis.

De acordo com os dados obtidos (TABELA 10) é possível concluir que todas as amostras avaliadas apresentaram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, porém nenhuma amostra demonstrou atividade antioxidante superior ao padrão ácido ascórbico.

TABELA 10 - ENSAIO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNICO.

AMOSTRA	AA EM RELAÇÃO À RUTINA (%)	AA EM RELAÇÃO AO ÁCIDO ASCÓRBICO (%)
Extrato Bruto	89,2	27,49
Hexano	74,8	23,05
Diclorometano	97,95	30,19
Acetato de Etila	135,21	41,67
Hidroalcoólica	71,34	21,98

AA: atividade antioxidante.

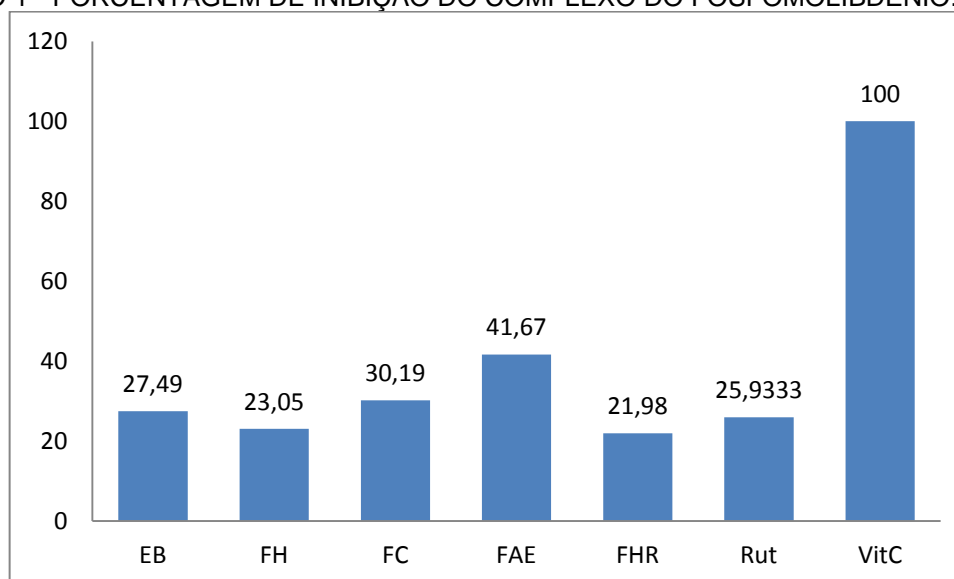
Considerando as atividades da rutina e do ácido ascórbico como padrão de referência, a fração acetato de etila apresentou o melhor desempenho com atividade antioxidante de 41,67% em relação ao ácido ascórbico, e quando comparada à rutina, um flavonoide de reconhecida ação antioxidante, ela se mostrou ainda mais ativa, superando em 35,21% a atividade da mesma, sendo, portanto o resultado mais promissor do ensaio.

A fração diclorometano também demonstrou uma relevante atividade antioxidante, atingindo 97,95% da atividade antioxidante exibida pelo padrão rutina, e 30,19% de atividade antioxidante em relação ao padrão ácido ascórbico.

Os resultados obtidos já eram esperados devido ao fato do ensaio fitoquímico preliminar (item.4.2) já ter indicado para as frações com melhor desempenho nesse ensaio a presença de compostos fenólicos, que tem potencial antioxidante.

O GRÁFICO 1 expressa a superior atividade da fração acetato de etila em relação à rutina e de aproximadamente 42% em relação ao ácido ascórbico.

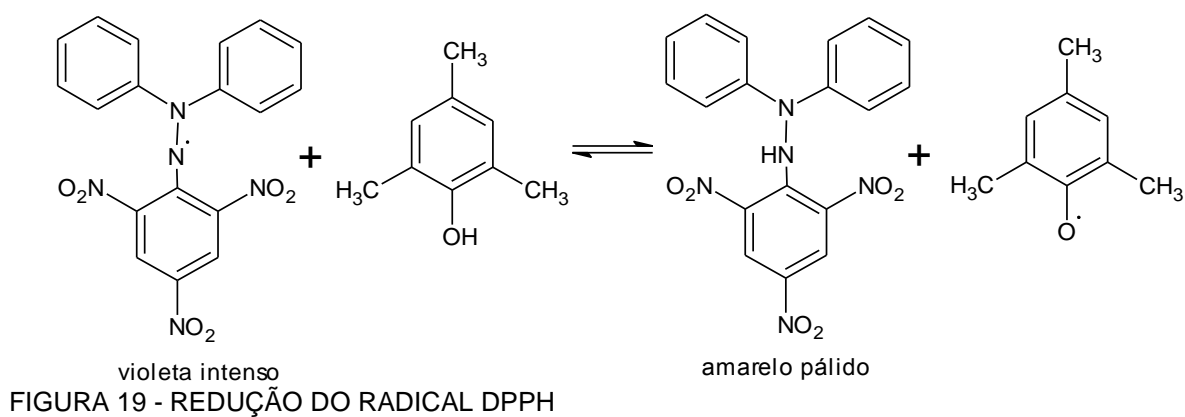
GRÁFICO 1 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO COMPLEXO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.



EB: EXTRATO BRUTO; FH: FRAÇÃO HEXANO; FDCM: FRAÇÃO DICLOROMETANO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FHR: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE; RUT: RUTINA; VITC: ÁCIDO ASCÓRBICO.

6.5.5 Método do Sequestro de Radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical estável por possuir um elétron desemparelhado deslocalizado por toda a molécula. Esse ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, o reduzindo a hidrazina. Quando uma substância doa um átomo de hidrogênio ao radical DPPH, a redução ocorre seguida pela mudança de coloração, de violeta intenso para amarelo pálido (FIGURA 20)



Para cada amostra testada foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC_{50} , ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH.

As equações da reta obtidas obtidos por regressão linear para o cálculo da IC_{50} estão demonstradas nos GRÁFICOS 2-8.

GRÁFICO 2-CURVA DO ÁCIDO ASCÓRBICOPELA REDUÇÃO DO DPPH

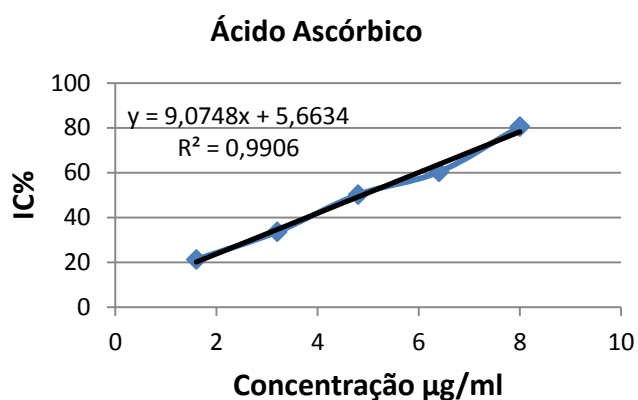


GRÁFICO 3-CURVA DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH

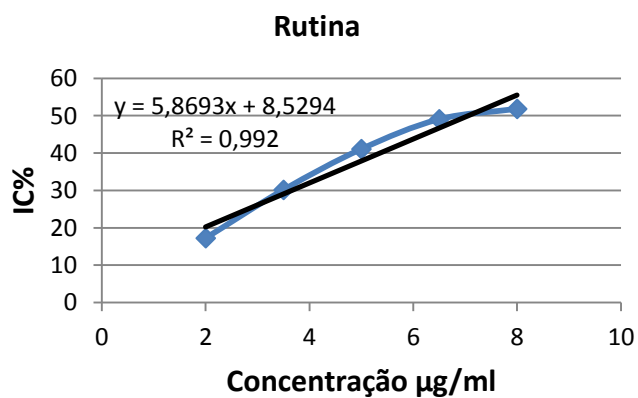


GRÁFICO 4-CURVA DO EBETOH PELA REDUÇÃO DO DPPH

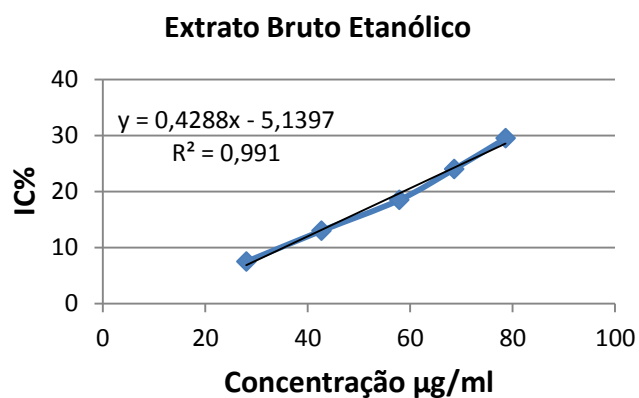


GRÁFICO 5-CURVA DA FHEX PELA REDUÇÃO DO DPPH

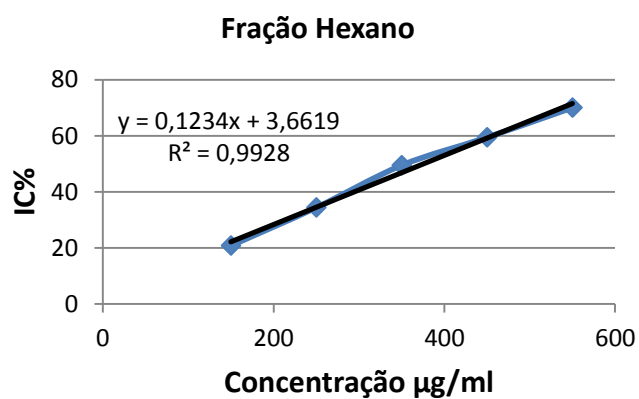


GRÁFICO 6-CURVA DA FDCM PELA REDUÇÃO DO DPPH

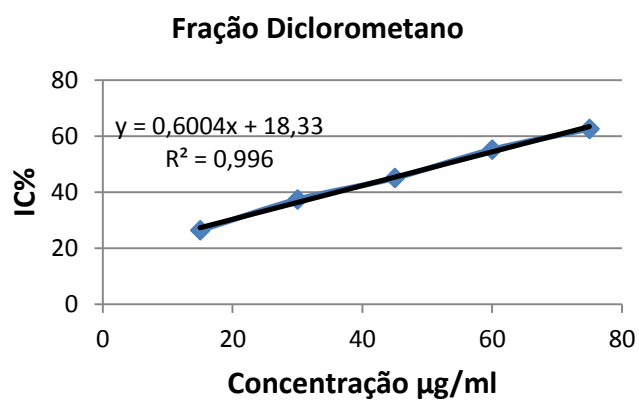


GRÁFICO 7-CURVA DA FACOET PELA REDUÇÃO DO DPPH

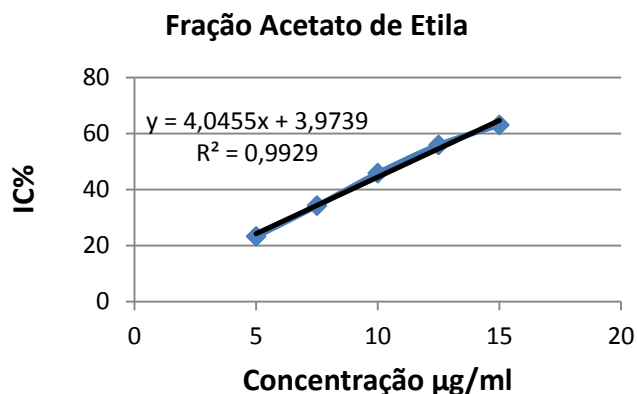
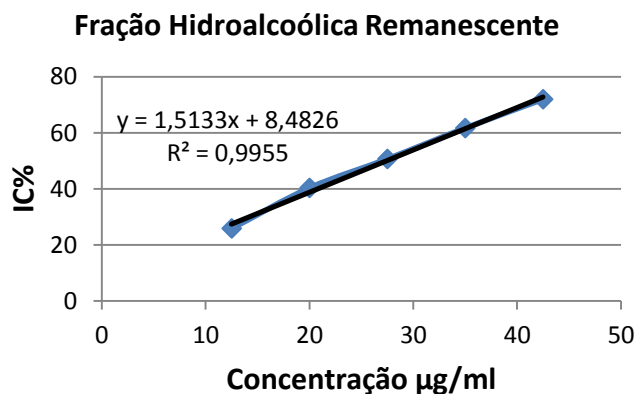


GRÁFICO 8-CURVA DA FHR PELA REDUÇÃO DO DPPH



Os resultados de IC_{50} correspondem às médias de três repetições mais o desvio padrão. Para verificar diferença estatística entre as amostras foi aplicado ANOVA e para a localização dessas diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando os valores de IC_{50} obtidos (TABELA 11) para as amostras e padrões analisados (ácido ascórbico com $IC_{50} = 4,7780 \pm 0,004$; rutina com $IC_{50} = 6,6228 \pm 0,0027$) podemos concluir que a fração acetato de etila apresentou o melhor desempenho ($IC_{50} = 10,9122 \pm 0,0066$), seguido do extrato bruto ($IC_{50} = 15,98 \pm 0,0026$) e fração hidroalcoólica ($IC_{50} = 24,1470 \pm 0,0204$). As frações de menor polaridade apresentaram os menores potenciais antioxidantes: fração hexano ($IC_{50} = 353,5353 \pm 0,0026$) e fração diclorometano ($IC_{50} = 54,3478 \pm 0,0065$).

TABELA 11 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

AMOSTRA	IC ₅₀ ±SD	TUKEY*
Ácido Ascórbico	4,7780±0,0040	a1
Rutina	6,6228 ±0,0027	a2
Acetato de Etila	10,9122±0,0066	a3
Extrato Bruto	15,98±0,0026	a4
Hidroalcoólica	24,1470±0,0204	a5
Diclorometano	54,3478±0,0065	a6
Hexano	353,5353±0,0026	a7

NOTA: Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

Oliveira *et al.*, (2008) avaliaram pelo método do DPPH a espécie *Guettarda pohliana* sendo que o extrato bruto (IC₅₀=55,52) e a fração acetato de etila (IC₅₀=33,31) apresentaram os melhores potenciais antioxidantes quando comparados ao padrão BHT (IC₅₀=16,90).

Dessa forma podemos sugerir que nestas espécies os compostos com maior potencial antioxidante possam estar solúveis no solvente de média polaridade, o acetato de etila, e que os compostos presentes no extrato bruto ajam de forma sinérgica contribuindo para o alto potencial antioxidante do mesmo.

6.5.6 Método de Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

O método de determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico fundamenta-se na medida da lipoperoxidação pela produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), que forma entre outros compostos o malondialdeído (MDA), que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma um cromóforo rosa (FIGURA 21) que pode ser mensurado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm (MIYATA, SMITH, 1996; KELLER *et al.*, 2000; DAWN LINSLEY *et al.*, 2005).

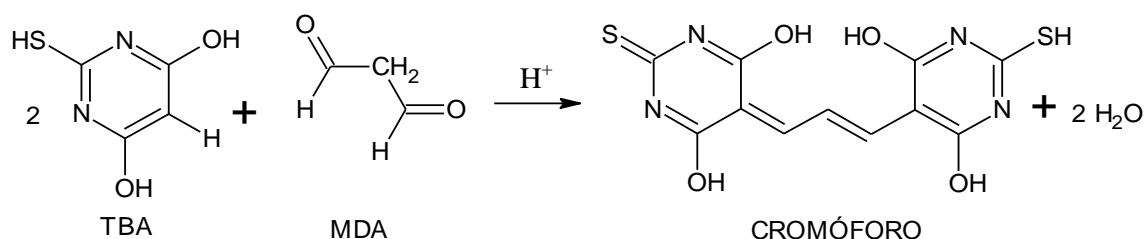


FIGURA 20 - FORMAÇÃO DO CROMÓFORO ROSA

Dessa forma, é possível avaliar o efeito do estresse oxidativo induzido e a proteção da lipoperoxidação conferida pelas substâncias antioxidantes que possam estar presentes nas amostras analisadas (DAWN-LINSLEY *et al.*, 2005).

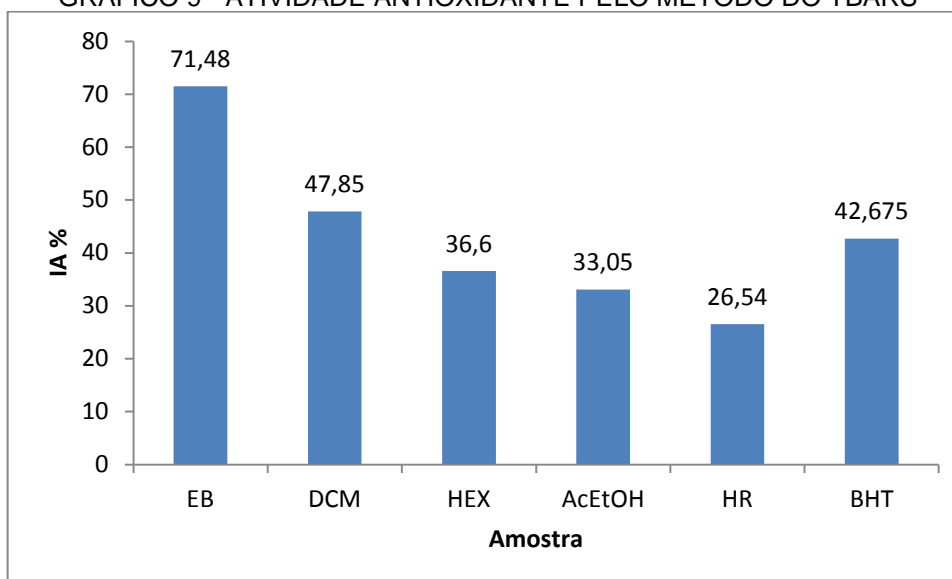
Nesse ensaio todas as amostras foram capazes de diminuir a lipoperoxidação, que é uma reação em cadeia iniciada pela retirada de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado por um radical livre. Esse mecanismo pode gerar radicais que propagam a reação peroxidativa e carbonilas tóxicas como o malonaldeído.

De acordo com os dados obtidos (TABELA 12, GRÁFICO 9) é possível concluir que o extrato bruto (IA=71,48%) foi a amostra mais eficaz contra a lipoperoxidação, seguido da fração hexano (IA=47,85%). Tanto o extrato bruto quanto a fração hexano apresentaram índices superiores ao controle BHT (IA=42,675).

TABELA 12 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS

Amostra	Índice Antioxidante (%)
Extrato Bruto	71,48
Hexano	47,85
Diclorometano	36,6
Acetato de Etila	23,05
Hidroalcoólica	26,54
BHT	42,675

GRÁFICO 9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS



Segundo SCHROETER *et al.*, (2000) a hidrofília dos compostos deve ser considerada em ensaios de peroxidação lipídica, uma vez que a baixa polaridade e alto coeficiente de partição de compostos lipofílicos permite uma melhor interação com a matriz lipídica promovendo proteção ao dano. Dessa forma, podemos sugerir que os desempenhos superiores ao padrão BHT apresentados pelo extrato bruto e pela fração hexano sejam atribuídos às características majoritariamente lipofílicas dessas amostras.

Pelos testes antioxidantes aqui realizados, utilizando o complexo fosfomolibdênio, o radical livre DPPH e TBARS, os resultados obtidos foram diferentes. Isto pode ser explicado pelos diferentes mecanismos de reações envolvidos entre os compostos com características antioxidantes presentes nestes materiais e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidade por estes, conforme foi descrito por SÀNCHEZ-MORENO (2002) e VASCONCELOS *et al.*(2007).

6.5.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da Difusão em Disco

Com o objetivo de avaliar o comportamento dos possíveis agentes antimicrobianos, foi realizada, inicialmente, uma triagem com o extrato bruto etanólico e frações através do teste de difusão em disco.

A metodologia de difusão em disco possibilitou a observação de zonas de halos de inibição de tamanhos diferentes. Durante o período de incubação o agente antimicrobiano se difunde a partir do disco em todas as direções do ágar (BLACK, 2002). Porém, deve-se atentar para o fato de que moléculas com maior massa molecular se dispersam mais lentamente quando comparadas aquelas de menor massa molecular, originando halos de inibição com tamanhos diferentes, portanto, as zonas de inibição observadas não reproduzem necessariamente uma medida fiel do potencial de inibição da amostra analisada, gerando a necessidade de considerar as características de dispersão de cada amostra.

Nesse estudo até mesmo os menores halos formados foram considerados como resultado positivo, uma vez que a metodologia de difusão em disco é uma técnica qualitativa. Os resultados (TABELA 13) demonstram que as amostras que foram ativas contra a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram o extrato bruto e a fração diclorometano. Foi ativa contra a bactéria gram positiva *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) a fração diclorometano. Foram ativas contra a bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785) e contra a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) o extrato bruto, fração hexano e diclorometano. Nenhuma amostra avaliada foi eficaz contra a bactéria gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922). O controle antifúngico Cetoconazol apresentou halo de inibição de 4 mm frente à levedura *Candida albicans*, enquanto que o controle Clorofenicol apresentou halo de inibição de 3 mm frente as bactérias avaliadas. Com exceção da fração diclorometano que apresentou um halo de inibição de 1,5 mm frente à levedura *Candida albicans*, todas as demais amostras avaliadas apresentaram halos de inibição pequenos, sendo, portanto considerado satisfatório para qualificar a capacidade inibidora de cada amostra somente o critério de ausência ou presença de halo de inibição.

TABELA 13 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA DIFUSÃO EM DISCO

Amostra	Método da difusão em disco				
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato Bruto	+	-	-	+	+
Hexano	-	-	-	+	+
Diclorometano	+	+	-	+	+
Acetato de Etila	-	-	-	-	-
Hidroalcoólica	-	-	-	-	-

+: presença de halo de inibição; -: ausência de halo de inibição

6.5.8 Concentração Inibitória Mínima

Segundo RIOS, RECIO e VILLAR (1988) e REIS (2006) a determinação da CIM aliada a outros sistemas de diluição é considerada a melhor metodologia para avaliar a suscetibilidade ou resistência de bactérias a antimicrobianos.

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para extratos de plantas quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram resultado positivo somente quando esse possa ser comparado aos de antibióticos conhecidos, uma vez que se trabalhe com uma fração já determinada (ALIGANIS *et al.*, 2001). De acordo com HOLETZ *et al.*, (2002), concentrações abaixo de 100 µg/mL apresentam boa atividade antimicrobiana, entre 100-500 µg/mL moderada e entre 500 e 1000 µg/mL fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

A revelação dos resultados foi realizada utilizando um corante indicador de oxi-redução, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTZ). As células vivas, através de enzimas específicas, reduzem o TTZ, inicialmente incolor, originando o Formazano, que se acumula no interior das células, resultando na alteração da coloração do meio para rósea (BELOTTI, BARROS e NERO, 1999).

A determinação da CIM (TABELA 14) foi realizada para o extrato bruto etanólico e frações obtidas a partir do extrato bruto etanólico. Também foi realizado o controle do solvente utilizado (metanol) que não apresentou inibição do crescimento microbiano.

Tabela 14 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA CIM

.Amostra	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)				
	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato bruto	1000	500	-	250	500
Hexano	100	250	-	250	250
Diclorometano	100	250	-	250	250
Acetato de Etila	-	250	-	-	250
Hidroalcoólica	-	100	-	500	500
Remanescente	-	100	-	500	500

CIM < 100 µg/mL → atividade antibacteriana boa; CIM 100-500 µg/mL → atividade antibacteriana moderada; CIM 500-1000 µg/mL → atividade antibacteriana fraca CIM > 1000 µg/mL → inativo. (-): inativo.

O extrato bruto etanólico apresentou CIM 250 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), ≥ 500 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e ≥ 1000 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A fração hexano apresentou CIM 250 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e ≥ 1000 µg/mL para *albicans* (ATCC 10231). A fração diclorometano apresentou CIM 250 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231) e ≥ 1000 µg/mL para *albicans* (ATCC 10231). A fração acetato de etila diclorometano apresentou CIM 250 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A fração hidroalcoólica remanescente apresentou CIM ≥ 100 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e ≥ 500 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Em avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana da espécie *G. uruguensis* (KELMER, 2011) observou para o extrato bruto atividade frente às bactérias *S. aureus* (MIC 1000 µg/mL) e *E. coli* (MIC 500 µg/mL). As frações FC e FHM apresentaram ação contra *S. aureus* com MIC 1000 µg/mL, respectivamente. Nos bioensaios de atividade antifúngica foi observado que apenas FC mostrou-se ativa frente à levedura *C. albicans* com CMI de 500 µg/mL.

No geral, a metodologia da CIM foi mais sensível que a metodologia de difusão em disco, pois através dela foi possível detectar uma atividade antimicrobiana que foi inicialmente, pela metodologia da difusão em disco, atribuída a um número menor de amostras.

Diferente dos resultados obtidos pela metodologia de difusão em disco, a determinação da atividade antimicrobiana pelo método da CIM, demonstrou que o extrato bruto etanólico e frações que não apresentaram atividade antimicrobiana na metodologia de difusão em disco inibiram em concentrações variadas o crescimento de todos os micro-organismos avaliados, com exceção da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) que foi resistente frente a todas as amostras avaliadas pelas duas metodologias. Através da metodologia da CIM foi possível visualizar, para o extrato bruto e algumas frações, atividade antimicrobiana não antes detectada pela metodologia da difusão em ágar. Foi observada para a fração hexano uma inibição frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e ao *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); fração acetato de etila frente ao *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231); hidroalcoólica remanescente frente *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785). Sugerimos que esses resultados possam estar relacionados à dificuldade de difusão no meio de cultura. De acordo com VALGA (2007) e ALVES (2008) a dificuldade de difusão de produtos naturais pode estar relacionada a características de hidrossolubilidade e massa molecular, uma vez que moléculas mais polares ou de maior massa molecular podem apresentar maior solubilidade e maior dispersão em meio líquido.

6.5.9 Avaliação da Atividade Alelopática

Para a avaliação da atividade alelopática foi utilizado o software livre R (versão 2.14.1) e o pacote Scott-Knott.

6.5.9.1 Avaliação do crescimento da radícula e hipocótilo

Com relação à radícula o extrato bruto apresentou para o grupo de concentração 0,1 mg maior influência inibidora em comparação com os demais grupos. Tal influência foi homogênea em todos os seus quadrantes. Os demais

grupos diferem-se dos controles, influenciando de forma positiva o crescimento. O quadrante 1 na diluição 0,2 mg apresentou crescimento menor.

Com relação ao hipocótilo todos os níveis de concentração diferem dos controles, apresentando influência inibidora, sendo que essa influência foi maior na concentração 0,1 mg (em todos os quadrantes), na concentração 0,4 mg (exceto no quadrante 2) e concentração 0,8 mg (no quadrante 4).

Os dados obtidos por meio do teste Scott-Knott estão listados na TABELA 15 e TABELA 16.

TABELA 15 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA O EXTRATO BRUTO

FONTE DE VARIAÇÃO	AMOSTRA	GL	SQ	QM	F	p-valor
Concentração/ Quadrante	Radícula	23	4730	205,65	5,919	2,07e-10*
	Hipocótilo	23	11467	498,6	14,94	<2e-16*
Resíduo	Radícula	96	3336	34,75		
	Hipocótilo	96	3205	33,4		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: teste *F*

TABELA 16 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA AO EXTRATO BRUTO DE *G. uruguensis*

EXTRATO BRUTO					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)	CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)
0,1-1	8	c	0,1-1	3,2	c
0,1-2	8,2	c	0,1-2	2,4	c
0,1-3	8,2	c	0,1-3	2,4	c
0,1-4	5,8	c	0,1-4	3,4	c
0,2-1	15	b	0,2-1	10,6	b
0,2-2	22,6	a	0,2-2	14,2	b
0,2-3	27	a	0,2-3	15,2	b
0,2-4	26,2	a	0,2-4	13,8	b
0,4-1	23	a	0,4-1	8,6	c
0,4-2	25,4	a	0,4-2	12	b
0,4-3	19,4	a	0,4-3	7,4	c
0,4-4	22,8	a	0,4-4	7,8	c
0,8-1	23,8	a	0,8-1	11,2	b
0,8-2	23,2	a	0,8-2	16,4	b
0,8-3	26,2	a	0,8-3	13,6	b
0,8-4	19,4	a	0,8-4	9,8	c
H2O-1	18,6	a	H2O-1	29	a
H2O-2	17,2	b	H2O-2	28	a
H2O-3	14,2	b	H2O-3	19,6	b
H2O-4	22,4	a	H2O-4	30,8	a
MeOH-1	15,4	b	MeOH-1	30,4	a
MeOH-2	13,4	b	MeOH-2	19	b
MeOH-3	12,8	b	MeOH-3	26,6	a
MeOH-4	16,4	b	MeOH-4	36,4	a

Com relação ao crescimento radicular das sementes expostas a fração hexano todos os níveis de concentração diferiram dos controles. Pode-se observar que os controles apresentaram crescimento menor que as soluções, sendo que esse efeito foi menor nos quadrantes 1 e 4 da água. As concentrações 0,2 mg ,0,4 mg e 0,8 mg foram as que sofreram as maiores influências positivas. A concentração 0,1 mg apresentou a maior influência inibidora do crescimento excerto no quadrante 1. Tal concentração foi agrupada com as concentrações 0,4 mg e 0,8 mg dos quadrantes 1 e 2, respectivamente.

Com relação ao crescimento do hipocótilo das sementes expostas a fração hexano todos os níveis de concentração diferiram dos controles, pois apresentaram

influência inibidora, sendo que esse efeito foi menor no quadrante 1 da concentração 0,8.

Os dados obtidos por meio do teste Scott-Knott estão listados na TABELA 17 e TABELA 18.

TABELA 17 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO HEXANO

FONTE DE VARIAÇÃO	AMOSTRA	GL	SQ	QM	F	p-valor
Concentração/ Quadrante	Radícula	23	4406	191,56	6,041	1,26e-10*
	Hipocótilo	23	8773	381,4	9,431	6,71e-16*
Resíduo	Radícula	96	3044	31,71		
	Hipocótilo	96	3883	40,4		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: teste F

TABELA 18 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA A FRAÇÕES HEXANO DE *G. uruguensis*

HEXANO					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
CONCENTRAÇÃO- QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)	CONCENTRAÇÃO- QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)
0,1-1	23,6	a	0,1-1	8,4	c
0,1-2	22,4	b	0,1-2	8,8	c
0,1-3	20	b	0,1-3	6,6	c
0,1-4	18,6	b	0,1-4	9,4	c
0,2-1	27,6	a	0,2-1	11,4	c
0,2-2	33,4	a	0,2-2	12,6	c
0,2-3	27,4	a	0,2-3	9,2	c
0,2-4	29,4	a	0,2-4	12,4	c
0,4-1	21,2	b	0,4-1	12,2	c
0,4-2	28,6	a	0,4-2	13,8	c
0,4-3	31	a	0,4-3	11,6	c
0,4-4	25,6	a	0,4-4	10,8	c
0,8-1	30,2	a	0,8-1	19,2	b
0,8-2	20,8	b	0,8-2	10	c
0,8-3	29,6	a	0,8-3	11,8	c
0,8-4	28,4	a	0,8-4	12,4	c
H2O-1	18,6	b	H2O-1	29	a
H2O-2	17,2	c	H2O-2	28	a
H2O-3	14,2	c	H2O-3	19,6	b
H2O-4	22,4	b	H2O-4	30,8	a
MeOH-1	15,4	c	MeOH-1	30,4	a
MeOH-2	13,4	c	MeOH-2	19	b
MeOH-3	12,8	c	MeOH-3	26,6	a
MeOH-4	16,4	c	MeOH-4	36,4	a

Com relação ao crescimento radicular das sementes expostas a fração diclorometano observa-se influência positiva em todas as concentrações e quadrantes.

Com relação ao crescimento do hipocótilo das sementes expostas a fração diclorometano observa-se que em todos os níveis e quadrantes houve influência inibidora de crescimento do hipocótilo.

Os dados obtidos por meio do teste Scott-Knott estão listados na TABELA 19 e TABELA 20.

TABELA 19 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO DICLOROMETANO

FONTE DE VARIAÇÃO	AMOSTRA	GL	SQ	QM	F	p-valor
Concentração/ Quadrante	Radícula	23	7417	322,5	7,356	8,13e-13*
	Hipocótilo	23	4487	195,11	4,749	2,89e-08*
Resíduo	Radícula	96	4208	43,8		
	Hipocótilo	96	3944	41,09		

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; F: teste *F*

TABELA 20 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA A FRAÇÕES DICLOROMETANO DE *G. uruguensis*

DICLOROMETANO					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)	CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)
0,1-1	32,4	a	0,1-1	18,4	b
0,1-2	33,6	a	0,1-2	16,8	b
0,1-3	34	a	0,1-3	18,8	b
0,1-4	29	a	0,1-4	16,6	b
0,2-1	31	a	0,2-1	19,4	b
0,2-2	27,4	a	0,2-2	17,4	b
0,2-3	34,6	a	0,2-3	13,8	b
0,2-4	26	a	0,2-4	15	b
0,4-1	31,2	a	0,4-1	17	b
0,4-2	33,4	a	0,4-2	15,4	b
0,4-3	30,8	a	0,4-3	17	b
0,4-4	36,6	a	0,4-4	19,6	b
0,8-1	33,4	a	0,8-1	22	b
0,8-2	28,2	a	0,8-2	15,8	b
0,8-3	32,4	a	0,8-3	12,4	b
0,8-4	35	a	0,8-4	17,6	b
H2O-1	18,6	b	H2O-1	29	a
H2O-2	17,2	b	H2O-2	28	a
H2O-3	14,2	b	H2O-3	19,6	b
H2O-4	22,4	b	H2O-4	30,8	a
MeOH-1	15,4	b	MeOH-1	30,4	a
MeOH-2	13,4	b	MeOH-2	19	b
MeOH-3	12,8	b	MeOH-3	26,6	a
MeOH-4	16,4	b	MeOH-4	36,4	a

Na fração acetato de etila observa-se influência positiva em todas as concentrações e quadrantes.

Com relação ao crescimento do hipocótilo a fração acetato de etila observa-se que em todas as concentrações e quadrantes houve influência inibidora de crescimento do hipocótilo.

Os dados obtidos por meio do teste Scott-Knott estão listados na TABELA 21 e TABELA 22.

TABELA 21 - FV OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

FONTE DE VARIÇÃO	AMOSTRA	GL	SQ	QM	F	p-valor
Concentração/ Quadrante	Radícula	23	7892	343,1	6,96	3,55e-12*
	Hipocótilo	23	5944	258,43	5,912	2,13e-10*
Resíduo	Radícula	96	4733	49,3		
	Hipocótilo	96	4197	43,72		

TABELA 22 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA A FRAÇÕES DICLOROMETANO DE *G. uruguensis*

ACETATO DE ETILA					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)	CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)
0,1-1	32	a	0,1-1	13,4	b
0,1-2	32,6	a	0,1-2	16,2	b
0,1-3	29,2	a	0,1-3	15,2	b
0,1-4	30	a	0,1-4	13,2	b
0,2-1	38,6	a	0,2-1	17,8	b
0,2-2	29,4	a	0,2-2	10,2	b
0,2-3	30	a	0,2-3	14,6	b
0,2-4	33,4	a	0,2-4	10,4	b
0,4-1	32,8	a	0,4-1	15,8	b
0,4-2	36,8	a	0,4-2	14,8	b
0,4-3	35,2	a	0,4-3	13,2	b
0,4-4	28,2	a	0,4-4	13,8	b
0,8-1	35	a	0,8-1	16,8	b
0,8-2	32,2	a	0,8-2	16,4	b
0,8-3	33,6	a	0,8-3	15,6	b
0,8-4	27	a	0,8-4	16,4	b
H2O-1	18,6	b	H2O-1	29	a
H2O-2	17,2	b	H2O-2	28	a
H2O-3	14,2	b	H2O-3	19,6	b
H2O-4	22,4	b	H2O-4	30,8	a
MeOH-1	15,4	b	MeOH-1	30,4	a
MeOH-2	13,4	b	MeOH-2	19	b
MeOH-3	12,8	b	MeOH-3	26,6	a
MeOH-4	16,4	b	MeOH-4	36,4	a

Com relação ao crescimento radicular da fração hidroalcoólica remanescente todos os níveis de concentração diferem dos controles. Pode-se observar que todas as concentrações apresentaram influência positiva em relação ao controle.

Assim como nas frações AcOEt e DCM, todos os níveis de concentração diferiram dos controles apresentando o efeito inibidor de crescimento do hipocótilo, mas não houve diferença entre eles.

Os dados obtidos por meio do teste Scott-Knott estão listados na TABELA 23 e TABELA 24.

TABELA 23 - FONTE DE VARIAÇÃO OBTIDA PELO TESTE SCOTT-KNOTT PARA A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE

FONTE DE VARIAÇÃO	AMOSTRA	GL	SQ	QM	F	p-valor
Concentração/ Quadrante	Radícula	23	7623	331,4	8,321	2,66e-14*
	Hipocótilo	23	5811	252,63	6	2,67e-11*
Resíduo	Radícula	96	3824	39,8		
	Hipocótilo	96	3770	39,27		

TABELA 24 - CRESCIMENTO DE *L. sativa* SUBMETIDA A FRAÇÕES DCM DE *G. uruguensis*

HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE					
RADÍCULA			HIPOCÓTILO		
CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)	CONCENTRAÇÃO - QUADRANTE	MÉDIA (mm)	SK (5%)
0,1-1	24,6	c	0,1-1	11,8	b
0,1-2	27,4	b	0,1-2	12,2	b
0,1-3	24	c	0,1-3	14	b
0,1-4	27,4	b	0,1-4	14	b
0,2-1	28,4	b	0,2-1	14,2	b
0,2-2	29	b	0,2-2	10,6	b
0,2-3	28	b	0,2-3	13,2	b
0,2-4	34,8	a	0,2-4	17,2	b
0,4-1	21,6	c	0,4-1	17	b
0,4-2	33,4	a	0,4-2	15,4	b
0,4-3	34,6	a	0,4-3	17	b
0,4-4	37,8	a	0,4-4	19,6	b
0,8-1	37,6	a	0,8-1	20,8	b
0,8-2	25,4	b	0,8-2	13,2	b
0,8-3	31	b	0,8-3	15	b
0,8-4	38,4	a	0,8-4	20,4	b
H2O-1	18,6	d	H2O-1	29	a
H2O-2	17,2	d	H2O-2	28	a
H2O-3	14,2	d	H2O-3	19,6	b
H2O-4	22,4	c	H2O-4	30,8	a
MeOH-1	15,4	d	MeOH-1	30,4	a
MeOH-2	13,4	d	MeOH-2	19	b
MeOH-3	12,8	d	MeOH-3	26,6	a
MeOH-4	16,4	d	MeOH-4	36,4	a

Em todos os ensaios realizados os controles expressaram resultados semelhantes sendo, portanto descartada a influência do solvente metanol.

Os testes biométricos de crescimento (medição da raiz e hipocótilo) são importantes parâmetros na avaliação de mudanças causadas por aleloquímicos (PIÑA-RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Possíveis efeitos causados por diversos aleloquímicos sobre o crescimento já foram sugeridos, destacando-se as alterações de membranas, na síntese proteica, na respiração, na conformação de moléculas, no alongamento celular e na ultraestrutura de ápices radiculares (FERREIRA, 2004) cujos mecanismos são pouco esclarecidos (FERREIRA e ÁQUILA 2000).

Os efeitos alelopáticos observados nas sementes de *L. sativa* frente ao extrato bruto e frações sugerem que apesar das amostras não terem afetado a germinação desta plântula, essas ocasionaram significativas influências no crescimento, pois quando comparados ao controle, verificou-se a presença de estímulo radicular (com exceção da [0,1] do EB) e inibição do crescimento do hipocótilo. Este desequilíbrio entre o crescimento da radícula e do hipocótilo pode impossibilitar o desenvolvimento, gerando plântulas anormais (FERREIRA; AQUILA, 2000).

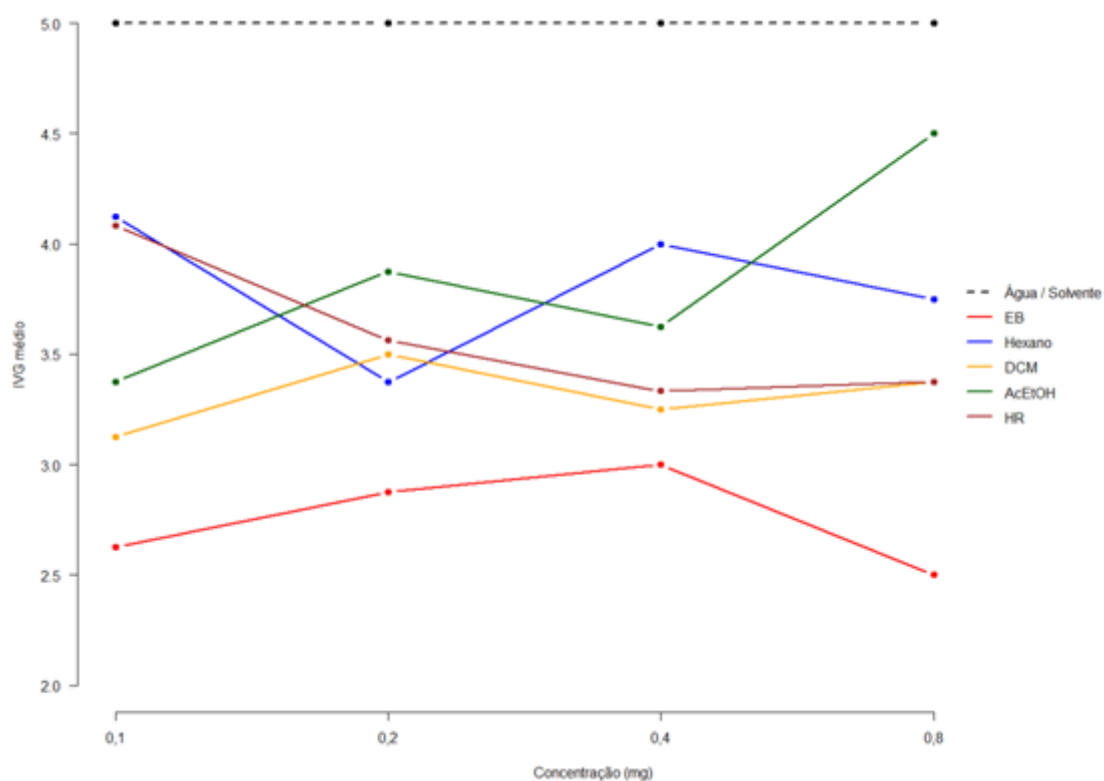
6.5.9.2 Avaliação do Índice de Velocidade de Germinação

Para avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG) primeiramente calculou-se a média do IVG dos 4 quadrantes em cada concentração de amostras, observando-se que todas as amostras diferem dos controles e que o extrato bruto também difere das demais. Quanto aos níveis de concentração não se observa nenhuma diferença visual significativa (TABELA 25, GRÁFICO 10).

TABELA 25 - MÉDIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

AMOSTRAS	CONCENTRAÇÕES			
	0,1 mg	0,2 mg	0,4 mg	0,8 mg
ÁGUA	5	5	5	5
METANOL	5	5	5	5
EB	2,625	2,875	3	2,5
HEX	4,125	3,375	4	3,75
DCM	3,125	3,5	3,25	3,375
AcOEt	3,375	3,875	3,625	4,5
HR	4,083	3,563	3,333	3,375

GRÁFICO 10 - MÉDIA DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO



Ao avaliar individualmente as amostras observa-se que o extrato bruto difere das demais amostras. A fração AcOEt e HEX não diferem entre si, assim como a fração HR e DCM. A água e o metanol não apresentaram diferença estatística (TABELA 26).

TABELA 26 - ANÁLISE DAS AMOSTRAS

AMOSTRA	MÉDIA	SK (5%)
ÁGUA	5	a
METANOL	5	a
AcOEt	3,844	b
HEXANO	3,813	b
HR	3,589	c
DCM	3,313	c
EB	2,75	d

ANOVA com p-valor < 0,05

Analisando os níveis de concentração globalmente (sem considerar as amostras), observa-se que as concentrações não diferem estatisticamente entre si, dado o p-valor da ANOVA (TABELA 27).

TABELA 27 - ANÁLISE DOS NÍVEIS DE DILUIÇÃO

CONCENTRAÇÃO	MÉDIA	SK (5%)
0,8	3,929	a
0,1	3,905	a
0,4	3,887	a
0,2	3,884	a

Por fim, analisando as concentrações dentro de cada amostra observa-se que dentro de todas as amostras as concentrações também não diferem entre si (TABELA 28).

TABELA 28 - ANÁLISE DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *L. sativa* SUBMETIDA AO EB E FRAÇÕES HEX, DCM, ACOET E HR DE *G. uruguensis*

AMOSTRAS	p-valor ANOVA	CONCENTRAÇÕES			
		0,1	0,2	0,4	0,8
ÁGUA/METANOL	-	5,000 a	5,000 a	5,000 a	5,000 a
AcOEt	0,089	3,375 a	3,875 a	3,625 a	4,500 a
HEX	0,224	4,125 a	3,375 a	4,000 a	3,750 a
HR	0,29	4,083 a	3,563 a	3,333 a	3,375 a
DCM	0,879	3,125 a	3,500 a	3,250 a	3,375 a
EB	0,197	2,625 a	2,875 a	3,000 a	2,500 a

7 CONCLUSÃO

A prospecção fitoquímica da espécie *G. uruguensis* revelou a diversidade de metabólitos secundários presentes na espécie, como: triterpenos; cumarinas; alcaloides; heterosídeos antociânicos; heterosídeos saponínicos; heterosídeos cianogenéticos e taninos, conduzindo a sugestão da estrutura de dois triterpenos pentacíclicos.

Os resultados para avaliação da atividade hemolítica foram negativos nos dois modelos avaliados, mesmo com a presença de saponinas, sugerindo tratar-se de saponinas não hemolíticas. Para os ensaios de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* as frações apresentaram DL_{50} variando de 80,31 (31,23-206,51 $\mu\text{g/mL}$) para (FDICLORO) a 667,67 (352,60-1264,28) $\mu\text{g/mL}$ para (FHR). Devido a alta letalidade do microcrustáceo frente à fração diclorometano, sugerimos que novos modelos de toxicidade devam ser realizados.

A atividade antioxidante, nos três métodos avaliados (fosfomolibdênio, DPPH e TBARS) foi bem expressiva. A fração AcOEt apresentou os melhores resultados quando avaliada pelo método do fosfomolibdênio (41, 67% de atividade em relação ao ácido ascórbico) e DPPH (AcOEt: $IC_{50}=10,9122$; ácido ascórbico: $IC_{50}=4,7780$). No método do DPPH o extrato bruto demonstrou a melhor capacidade de diminuir a lipoperoxidação, apresentando um IA= 71,48%, bem superior ao observado pelo padrão BHT. Considerando a existência de atividade antioxidante, verifica-se a relevância do isolamento dos compostos responsáveis por estes efeitos, no sentido de obter antioxidantes naturais.

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicou que embora o extrato bruto e frações não tenham inibido a bactéria gram negativa *E. coli*, as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foram inibidas pelo extrato bruto e frações, com a ressalva de que a bactéria *S. aureus* não foi inibida pela fração AcOEt e hidroalcoólica e que a fração AcOEt também não foi capaz de inibir a bactéria *P. aeruginosa*. A realização das duas metodologias (difusão em disco e MIC) permitiu concluir que a metodologia da CIM foi mais sensível em relação à difusão em disco, fato que provavelmente ocorreu devido à dificuldade de difusão em disco de moléculas de alta polaridade e/ou maior massa molecular.

O ensaio alelopático, de uma forma geral demonstrou que o extrato bruto e frações apresentaram influência positiva com relação ao crescimento da radícula e influência negativa para o desenvolvimento do hipocótilo de sementes de *L. sativa*.

REFERÊNCIAS

- ACHILLE, F.; MOTLEY, T. J.; LOWRY P. P. & JÉREMIE, J.; 2006. Polyphyly in *Guettarda* L. (Rubiaceae, Guettardeae) based on nrDNA ITS sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden*.
- AGRA, M. F. Contribuição ao estudo de plantas medicinais da Paraíba. In: VI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1980, Fortaleza. Resumos, 1980. p. 64-66.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C.; 2007. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 110, No. 1, p. 76-91.
- ALMEIDA, M. Z.; NAIKE, S.; BATTHACHARYA, J. Atividade antiinflamatória da *Guettarda platypoda*. In: REUNIÃO DA SBPC, 34. [S.1.], 1982. Anais... [S.1.: s.n.], 1982. Seção 26.G.1.7.
- ALYNE V. BARROS, ALINE O. DA CONCEIÇÃO, ISABELA C. SIMONI, CLARICE W. ARNS, MARIA JUDITE B. FERNANDES.; 2010. MECHANISMS OF ANTIVIRAL ACTION OF SEEDS FROM *Guettarda angelica* Mart. AGAINST BOVINE AND SWINE HERPESVIRUSES IN VITRO. *VIRUS REVIEWS AND RESEARCH* Vol. 15, Nr. 2, p. 78 – 91
- ANDERSSON, L. A Provisional Checklist of Neotropical Rubiaceae. **Scripta Botanica Belgica**, p. 1-199, 1992.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 161, p. 105-121.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; DE MELLO, J. F.; 1988. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. *Phytochemistry*, Vol. 27, No. 9, p.2927-2930.
- BARBOSA, M. R.; 2010. *Guettarda* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014052>).

BARBOSA, M.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J.G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M.F.; PESSOA, M.C.R.; SALAS, R.; SOUZA, E.B.; DI MAIO, F.R.; MACIAS, L.; ANUNCIAÇÃO, E.A.; GERMANO FILHO, P. & OLIVEIRA, J.A. et al. 2012. Rubiaceae. In: Forzza, R.C. et al. (org.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000210>>.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO JR, J. X. de. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Orgs.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 147-148.

BARREIRO, E.J.; 2001. Sobre a química dos remédios, dos fármacos e dos medicamentos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, Vol. 3, p. 4-9.

BARROS, A. V.; ARAÚJO, L. M.; SCHMITT, A.C.; SIMONI, I. C.; FERNANDES, M. J. B.; 2007. Atividade antiviral *in vitro* de *Guettarda angelica* frente aos herpes vírus bovino e suíno. *J. Bras. Fitomed*, Vol. 5, p.154.

BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, M. Z.; 1985. Isolation of the constituents os the root-bark of *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products*, Vol. 48, No. 1, p.148-149.

BISPO, N. J.; FRANCISCO, N. M. C.; SCHMITT, A.C.; 2007. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato metanólico da planta *Guettarda angélica* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. *Laes and Haes*, Vol. 4, p. 164-169.

BOLZANI, V. DA S.; TREVISAN, L. M. V.; YOUNG, M.C.M. Caffeic acid esters and triterpenes of *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p.2089 2091, 1991.

Botanical Garden (on line). <http://www.nybg.org/bsci/res/delpic2.html>

BRASIL. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 546 p.

BREMER, B. & ERIKSSON, O.; 2009. Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamily, and tribes. *International Journal of Plant Science*, Vol. 170, p. 766-793.

BRILLANCEAU, M.H.; KAN-FAN, C.; KAN, S.K.; HUSSON, H.P. Plants from New Caledonia, v.89. Guettardine, a possible biogenetic intermediate in the formation of

Corynanthe-Cinchona alkaloids. *Tetrahedron Letters*, v.25, n.26, p.2767-2770, 1984

BROCHINI, C. B.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. DA S. An oleanane acid from *Alibertia edulis*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 5, p. 1293-1295, 1994.

CALIXTO, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 131-134.

CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SIVILA, S.C.; DE TOMMASI, N.; SORRENTINO, L.; PIZZA, C.; 1998. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. *Planta Medica*, Vol. 64, No. 4, p. 348-352.

CRAGG, G. C.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development, *Journal of Natural Products*, v. 60 (1), p. 52-60, 1997.

CRONQUIST, A. **An integrated system of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p. il. CUNHA, A. P. de; ROQUE, O. R. A Farmacognosia nos estudos farmacêuticos. In: CUNHA, A. P. de (Org.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 4-9.

CUNHA, A. P. de; ROQUE, O. R. A Farmacognosia nos estudos farmacêuticos. In: CUNHA, A. P. de (Org.). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 4-9.

DE FEO V, DE SIMONE F, SENATORE F 2002. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 61: 573-578.

DELPRETE, P. & R. Cortés. 2002. Sinopsis of Neotropical Rubiaceae Genera. New York

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G.; 2012. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: na overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia*, Vol. 63, No.1, p. 101-128.

DELPRETE, P. G; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Rubiáceas. v. 1, In Reitz, R. Flora Catarinense, RUBI: 1-344. Itajaí: TBG/Smithsonian, 2004.

ELISABETSKY, E. 1999. **Etnofarmacologia como ferramenta de busca de substâncias ativas**. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MIENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis.

ELISABETSKY,E.; WANNMACHER, L. 1993. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, **38**: 137-143.

FANSHAW, D. B. 1950. Forests Products of British Guiana. Part II. Minor Forest Products. 81 pp. Forestry Bulletin No. 2 (New Series). Forest Department, British Guiana.

FERREIRA, A.C.; 2009. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonical coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 126, p. 159-175.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A.G. 2004. Interferência: competição e alelopatia. Pp. 251-262. In: Ferreira, A.G. & Borghetti, F. (Eds). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Ed. Artmed.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G.; 2005. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. *Acta Scientiae Veterinariae*, Vol. 33, No. 3, p. 291-296.

GANDHIMATHI R, SARAVANA KUMAR A, SENTHIL KUMAR KK, PRAVEEN KUMAR K., UMA MAHESWARI J.; 2009. Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of *Guettarda speciosa* (L.) in experimental animals. *J. Pharm. Sci. & Res.*, Vol. 1, No. 2, p. 61-66.

GOVAERTZ, R.; FRODIN, D.G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D.M. & DAVIDS, A.P. 2007. Word checklist & bibliography of Rubiaceae. The trustees of Royal Botanic Gardens, Kew.

GRENAND, P.C. Pharmacopées. Traditionnelles em Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi. Editorial 1-ORSTROM, Coll. Mem No. 108. Paris, 1987.

HAYEK EWH, JORDIS U, MOCHE W, SAUTER F 1989. A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* 28: 2229-2242

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. cap. 29, p.765-792.

HOLETZ, F. B., *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid glycosides. IPMEB- Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia. Seplantec. Subsecretaria de Ciências e Tecnologia. Salvador, 1979.

JOHNTON, M. and A. COLQUHOUN. 1996. Preliminary ethnobotanical survey of Kurupukari: an Amerindian settlement of central Guyana. *Economic Botany*, Vol. 50, No.2, p. 182-194.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; HUSSON, H. P.; 1986. Plants of New Caledonia. Part 107. 3-Epi-antirrhine, a new alkaloid from *Guettarda heterosepala*. *Journal of Natural Products*, Vol. 49, No. 6, p. 1130-1132.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; PUSSET, J.; CHAUVIERE, G.; HUSSON, H.P. Plants from New Caledonia. Part 98. Three quinicine derived alkaloids from *Guettarda trimera*. *Phytochemistry*, v.24, n.11, p.2773-2775, 1985.

KAN-FAN, C.; HUSSON, H. P.; 1979. Isolation and biomimetic conversion of 4,21 dehydrogeissoschizine. *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications*, Vol. 22, p. 1015-1016.

KAOU, A.M.; MAHIOU-LEDDER, V.; HUTTER, S.; AÏNOUDDINE, S.; HASSANI, S.; YAHAYA, I.; AZAS, N.; OLLIVIER, E.; 2008. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 116, p.74-83.

KOIKE, K.; CORDELL, G. A.; FARNSWORTH, N. R.; FREER, A. A.; GILMORE, C. J.; SIM, G. A. New cytotoxic diterpenes from *Rondeletia panamensis* (Rubiaceae). *Tetrahedron*, v. 36, n. 9, p. 1167-1172, 1980.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D. & FRANÇA-NETO, J.B. (eds.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.4, p.1-26.

LACHMAN L, LIEBERMAN HA, Kanig JL 2001. *Teoria e Prática na Indústria*

Farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

LEMES, GERALDA DE FÁTIMA; FERRI, PEDRO HENRIQUE; LOPES, MÁRCIA NASSER. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE HYPTIDENDRON CANUM (POHL EX BENTH.) R. HARLEY (LAMIACEAE). QUÍM. NOVA, SÃO PAULO, V. 34, N. 1, 2011 .

LEUNG AY, FOSTER S 1996 *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drug and cosmetics*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.

LEITE JPV, LOMBARDI JA, CHIARI E, OLIVEIRA AB 2001. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. *Rev Bras Farmacogn* 11: 77-87.

LIMA, G. S., *et al.*, Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 284–289, 2009b.

MABBERLEY, D.J. 2008. *Mabberley's Plant-Book.: A portable dictionary of plants, their classification and uses*. Third edition, Cambridge University Press.: vii-xviii, 1-1021.

MAHADY, G.B. 2001. Global harmonization of herbal health claims. **Journal of Nutrition**, 131: 1120-1123.

MATOS, M.E.O.; SOUZA, M.P. MACHADO, M.I.L., BRAZ-FILHO, R.; 1986. Quinovic acid glycosides from *Guettarda angélica*. *Phytochemistry*, Vol. 25, No. 6, p.

MCLAUGHLIN JL, ROGERS LL, ANDERSON JE (1998). The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals, *Drug Information Journal* 32: 513-524.

MENDOZA, H. 2000. Especies de Rubiaceae del flanco oriental de la cordillera Oriental, norte de los Andes. *Biota Colombiana* Vol. 1 (2): 224-229.

MENNEGA, E. A., TAMMENS-DE ROOIJ, W. C. M. and JANSEN-JACOBS, Eds. 1988. Check-list of woody plants of Guyana. 281 pp. Ede, The Netherlands: Tropenbos Foundaion.

MEYER, B. N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v.45, p.31-34, 1982.

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica**. Apostila da disciplina de

fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MONTAGNAC, A.; LITAUDON, M.; PAIS, M. Quinine and quinine derived alkaloids from *Guettarda noumeana*. *Phytochemistry*, v.46, n.5, p.973-975, 1997.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

MOURA, F. D. S.. **Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antimalárica, Larvívica, Antioxidante e Anticolinesterásica de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade de Alagoas, Maceió, 2006.

NAGASAMPAGI, B. A.; ROWE, J. W.; SIMPSON, R.; GOAD, L. J. Sterols of coffee. **Phytochemistry**, v. 10, n. 5, p. 1101-1107, 1971.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Orgs.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 14-18.

OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F.; BOLZANI, V. DA S. Acylated flavonol glycosides and terpenoids from the leaves of *Alibertia sessilis*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 3, p. 257-259, 1997.

OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; SENA, S.B.; COSTA, W.F.; SARRAGIOTO, M.H.; SANTIN, M.O.; Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Química Nova*, v.31, n.4, p.755-758, 2008.

PEREIRA, M.S.; BARBOSA, M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Botanica Brasílica* 18, n.2, p. 305-318, 2004.

PIÑA-RODRIGUEZ, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. & Peixoto, M.C. 2004. Testes de Qualidade. Pp. 251-262. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Eds). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Ed. Artmed.

PINTO, A.C. **O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira**. *Química Nova*, v. 18 n. 6, p. 608-615, 1995.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R.A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas**, *Química Nova*, v. 25 n.1, p. 45-59, 2002.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RIBEIRO, E. Plantas Medicinais e Complementos Bioterápicos. Publicações Europa-América, 40, 1992.

SARAVANA KUMAR A, AMUTHA P, GANDHIMATHI R, DHANAPAL R.; 2009. Study on phytochemical profile and antiepileptic activity of inner bark of *Guettarda speciosa* (L.). *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, Vol. .8, No. 1.

TESTA, G.; OLIVEIRA, P. R. N.; SILVA, C.C; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; 2012. Constituintes químicos das folhas e avaliação anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Química Nova*, Vol. 35, No. 3, p. 527-529.

THAMIZHVANAN, K.; PAVAN, K.P.; THANUJA, B.; MADHU, M.D.; KRISHNAKISHORE, P.; PRAVEN, K.; 2010. Antibacterial and antifungal activities of various extracts of *Guettarda speciosa* L. *International Journal of Phytopharmacology*, Vol. 1, No. 1, p. 20-22.

TREVISAN, L. M. V. **A química micromolecular e a classificação de Rubiaceae**. 52 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1993.

UGAZ, O. L. **Investigación fitoquímica - Métodos en el estudio de productos naturales**. 2ed. Lima, Pontificia Universidad Católica del Peru, 1994.

VERMES, B.; WAGNER, H. Synthesis and structure proof of morindone 6-Ogentiobioside from *Morinda tinctoria*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2493-2494, 1980.

WEINER, M. A. Secrets of Fijian Medicine. Govt. Printer, Suva, Fiji. 1984, 93.

WEINER, M. A; 1971. Ethnomedicine in Tonga. *Econ. Bot*, Vol. 25, p. 423-450.

YAGA, S.; KAZUHIKO, K. On the termite-resistance of Okinawan timbers. IX.

Termiticidal substance from the wood of *Guettarda speciosa* L. Mokuzai Gakkaishi, v.31, n.8, p.684-687, 1985.

YOUNG, M. C. M.; ARAÚJO, A. R.; DA SILVA, C. A.; LOPES, M. N.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. DA S. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnioides*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 936-938, 1998.

YOUNG, M. C. M.; BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C.; GOTTLIEB, H. E.; TREVISAN, L. M. V.; BOLZANI, V. DA S. Fungitoxic non-glycosidic iridoids from *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3433-3435, 1992.